

HILTON MUNIZ LEÃO FILHO

**Ressonância magnética multiparamétrica do fígado em
pacientes com esteato-hepatite não alcoólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Radiologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel de Souza Rocha

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2022**

HILTON MUNIZ LEÃO FILHO

**Ressonância magnética multiparamétrica do fígado em
pacientes com esteato-hepatite não alcoólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Radiologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel de Souza Rocha

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2022**

*À querida **Renata**, por todo o apoio e ajuda que me deu durante o processo e em nossa vida juntos. Você é uma grande inspiração para mim.*

*À minha filha **Sofia**, cuja alegria contagiante e energia tornam minha vida muito mais interessante.*

*A meus pais, **Hilton** (in memoriam) e **Terezinha**, pelo amor e carinho incondicionais e aos ensinamentos que me passaram durante a vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Manoel de Sousa Rocha**, pela orientação nesse trabalho e em outros temas - dentro e fora da profissão. Sua dedicação à radiologia é uma constante inspiração. Obrigado pela confiança, por compartilhar seus conhecimentos e pelo incentivo, assim como pelas oportunidades ao longo destes anos.

À minha família, meus irmãos **Gilberto** e **Letícia**, meus sogros **Valdo** (*in memoriam*) e **Wanda**, minhas cunhadas **Raquel** e **Ana Paula** e minhas queridas sobrinhas e afilhadas **Stela**, **Isis**, **Ana**, **Catarina**, **Manuela** e **Eduardo**, pela amizade e carinho e por compreenderem minhas ausências. A **Patrícia Sousa Oliveira**, que organiza minha vida e me abastece de café.

À **Profa. Dra. Claudia Oliveira**, pela enorme contribuição na realização deste trabalho desde seu início, assim como pela ajuda nos momentos de dúvida nos aspectos clínicos dos pacientes envolvidos no estudo. Obrigado pelo envolvimento e pela dedicação a essa pesquisa.

À **Dra. Cinthia Ortega**, pela importante ajuda durante o todo o projeto, com apontamentos valiosos. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, que despertou em mim a paixão pelo trabalho científico.

À **Profa. Dra. Cláudia Leite**, ao **Prof. Dr. Edson Amaro**, ao **Prof. Dr. José Jukemura** e ao **Prof. Dr. Eduardo Caçado Oliveira**, pela contribuição na banca de qualificação. Seus apontamentos foram fundamentais para o amadurecimento deste trabalho.

Aos grandes amigos, **Paul Clark** e **Wanida Chua-Anusorn**, que tiveram um papel fundamental no trabalho, transformando a ideia inicial em realidade com o desenvolvimento do software de pós-processamento. A cooperação inicial se transformou em uma ótima amizade do outro lado do globo. Obrigado pela grande ajuda.

Ao brilhante **Bernd Foerster**, pela ajuda em conduzir os experimentos iniciais, construção das sequências de ressonância e grandes discussões sobre o tema.

Aos amigos físicos médicos do departamento, **Dra Maria Otaduy, Dr. Khalil Chain e Dr. Bruno Pastorello**, pela ajuda na construção do projeto, desde o início e pela paciência ao explicar a complexa física da RM.

A todos os **biomédicos e funcionários do serviço de Ressonância Magnética do Hospital das Clínicas**, com sua disposição e interesse no trabalho. Sem vocês o trabalho certamente não poderia ser realizado. Sua ajuda foi fundamental, muito obrigado por toda a ajuda e amizade nesse período. Agradeço em especial à **Lia Souza Neta, Adelinda Gonçalves e Mara Silva**, pelo apoio na execução e organização do trabalho.

A **Dra. Fabiana Lima**, pela enorme contribuição na revisão histológica das biópsias e pela paciência de discutir em detalhes as dúvidas sobre a esteatohepatite não alcoólica.

Aos **colegas de trabalho e residentes** que auxiliaram na construção e no andamento do projeto, por vezes se dedicando a avaliações, como voluntários do projeto. Muito obrigado pela paciência e compreensão durante o trabalho.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e a todos os **pacientes do serviço público envolvidos no projeto**, sem cuja participação não seria possível esse trabalho. Vocês não só possibilitaram a realização deste trabalho, mas são o motivo dele existir. Que esta pesquisa possa beneficiar muitas pessoas.

*“It is very hard to predict,
especially the future.”*

Niels Bohr

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
3 MÉTODOS	8
3.1 Desenho e População	9
3.2 Ressonância Magnética	11
3.2.1 Aquisição.....	11
3.2.2 Pós-processamento	12
3.2.3 Esteatose e ferro.....	12
3.2.4 Fibrose	15
3.2.5 Variabilidade interobservador	23
3.3 Patologia	24
3.4 Desfechos e análise estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Estadio de Fibrose	31
4.2 Balonização e Inflamação Lobular	41
4.3 Interferência do tempo entre a biópsia e a RM sobre as correlações:.....	44
4.4 Interferência dos valores de R2* sobre os resultados.....	44
4.5 Correlação entre esteatose e a fração de gordura obtida pela RM.....	45
4.6 Correlação entre depósito de ferro e valor de R2* obtido pela RM.....	48
4.7 Análise interobservador.....	51
4.7.1 Avaliação RM.....	51
4.7.2 Avaliação histológica.....	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	65
7 ANEXOS	68
8 REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALM	- Algoritmo de Levenberg-Marquardt
AUROC	- Área abaixo da curva de característica de operação do receptor
CIC	- Correlação intraclasse
DHGDM	- Doença hepática gordurosa associada a disfunção metabólica
DHGNA	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
EEF	- Espaço extracelular do fígado
EHNA	- Esteato-hepatite não alcoólica
ERM	- Elastografia
esp.	- Especificidade
ET	- Elastografia transitória
EUA	- Estados Unidos da América ()
FAECnv	- Componente não vascular da fração de água extracelularFH - Fibrose hepática
FIB4	- <i>Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index - APRI e fibrosis index based on the four factor</i>
HC	- Hepatopatia crônica
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	- Hematoxilina-eosina
HPC	- Hepatocelular
IC	- Intervalo de confiança
ICS	- <i>Supersonic shear imaging</i>
IEOC	- <i>Shear-wave elasticity imaging</i>
IIFRA	- <i>Acoustic radiation force impulse imaging</i>
LIF	- <i>Liver inflammation and fibrosis</i>
MEGE	- <i>multi-echo gradient echo 2D</i>
MESE	- <i>Multi-echo spin echo T2 2D</i>

MIIV	- <i>Intravoxel incoherent motion</i>
PDFF	- <i>Proton Density Fat Fraction</i>
RDI	- Regiões de interesse
RM	- Ressonância magnética
RMC	- Relaxometria de multicomponente
ROC	- Característica de operação do receptor
SBH	- Sociedade Brasileira de Hepatologia
sens.	- Sensibilidade
SRE	- Sistema reticuloendotelial
US	- Ultrassonografia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos de base e características histológicas dos indivíduos.....	30
Tabela 2 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação à fibrose incluindo a área total do fígado e o RDI circular, mais correlações gerais.....	31
Tabela 3 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro FAECnv de RMC em relação às classificações histológicas, usando a área total do fígado e a RDI circular.....	33
Tabela 4 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação a balonização e inflamação lobular, utilizando a área total do fígado	42
Tabela 5 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro FAECnv de RMC em relação às classificações histológicas de balonização e inflamação lobular, usando a área total do fígado	43
Tabela 6 - Dados de correlação relacionados a intervalos distintos entre a biópsia e o exame de RM.....	44
Tabela 7 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação ao PDFF, utilizando a área total do fígado.....	46
Tabela 8 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro PDFF de RMC em relação ao as classificações histológicas de esteatose, usando a área total do fígado	46
Tabela 9 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação ao R2*, como um substituto para siderose, utilizando a área total do fígado	48
Tabela 10 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro R2* de RMC em relação ao as classificações histológicas de siderose, usando a área total do fígado	49

Tabela 11 - Coeficientes de correlação e IC95% entre os parâmetros de RM entre dois leitores diferentes, realizada num subgrupo de 32 pacientes	51
Tabela 12 - Coeficientes de correlação entre os dados de biópsia da primeira leitura (prospectiva) e a revisão de biópsia, realizada num subgrupo de 67 pacientes.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de mapa de PDFF em um paciente do estudo	14
Figura 2 - Exemplo de mapa de $R2^*$ da água livre em um paciente do estudo	15
Figura 3 - Análise multiexponencial do relaxamento $R2$ no parênquima hepático	18
Figura 4 - Três “padrões de teste”: mapas de um amplo espectro de valores de parâmetros possíveis	19
Figura 5 - A) imagens sintéticas da Figura 4 que aparecem nos 9 tempos de aquisição de imagem diferentes, normalmente adquiridas em um aparelho de ressonância magnética. Quanto mais tempo o tempo de medição, menos sinal que foi medido. C) o ajuste das imagens usando o pós-processamento habitual pelo ALM - verificar a diferença do resultado com os dados iniciais, demonstrados em B. D) resultado do ajuste usando a técnica desenvolvida para a RMC do trabalho	20
Figura 6 - Exemplo dos mapas de fração de água extracelular (FAEC) iniciais	21
Figura 7 - Progressão dos mapas de fração de água extracelular	22
Figura 8 - Regiões de interesse utilizadas para se avaliar correlação entre a FAEC _{nv} e o grau de fibrose	23
Figura 9 - Fluxograma de seleção dos pacientes e voluntários	29
Figura 10 - Representação gráfica dos mapas de FaEC _{nv} (propostos como um biomarcador de fibrose) com cores no espectro de classificação histológica proposto pela NAS-CRN	35
Figura 11 - Mapas de fração de água extracelular para cinco indivíduos com diferentes estágios de fibrose	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM usando a área total do fígado e o estágio da fibrose da histologia	32
Gráfico 2 - Curvas ROC para distinção dos estágios de fibrose em relação ao parâmetro FAECnv usando a área total do fígado.....	34
Gráfico 3 - Correlação entre o parâmetro FAECv da RM, como um substituto para o corpo vascular extracelular, usando a área total do fígado e o estágio da fibrose da histologia	36
Gráfico 4 - Correlação entre o parâmetro FAECnvC (RDI circular) da RM e o estadio da fibrose na histologia	39
Gráfico 5 - Distinção dos estágios de fibrose em relação ao parâmetro FAECnvC, com o uso da RDI circular.....	40
Gráfico 6 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM e a balonização na histologia	42
Gráfico 7 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM e a inflamação lobular na histologia	43
Gráfico 8 - Falta de padrão de distribuição entre R2* e o parâmetro FAECnv	45
Gráfico 9 - Correlação entre o parâmetro PDFF da RM e o grau de esteatose na histologia	46
Gráfico 10 - Curvas ROC para distinção dos graus de esteatose em relação ao valor de PDFF.....	47
Gráfico 11 - Correlação entre o parâmetro R2* da RM e o grau de siderose na histologia.....	49
Gráfico 12 - Curvas ROC para distinção dos graus de siderose em relação ao valor de R2*	50
Gráfico 13 - Bland-Altman para fibrose, mostrando média de diferenças de -0,25, com desvio padrão inferior de -1,14 e superior de 0,91.....	51
Gráfico 14 - Bland-Altman para esteatose, mostrando média de diferença de 0,6, com desvio padrão inferior de -2,21 e superior de 3,41.....	52

Gráfico 15 - Bland-Altman para R2*, mostrando média de diferença de -2,19, com desvio padrão inferior de -19,75 e superior de 15,37..... 52

RESUMO

Leão Filho HM. *Ressonância magnética multiparamétrica do fígado em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é uma das principais causas de doença hepática crônica, intimamente relacionada à obesidade e à síndrome metabólica, representando um risco significativo de inflamação e fibrose deste órgão para os pacientes. Para melhorar o diagnóstico e monitoramento desses pacientes, as modalidades de imagem estão sendo utilizadas no intuito de desenvolver biomarcadores não invasivos dessas patologias. Neste estudo, foram avaliados pacientes com EHNA utilizando relaxometria de multicomponente (RMC) por ressonância magnética (RM) visando validar biomarcadores de imagem para fibrose, inflamação, esteatose e siderose. Resultados: pacientes com diagnóstico de EHNA por biópsia percutânea (n = 106) foram selecionados prospectivamente para um exame de ressonância magnética quantitativa, que dura menos de 10 minutos, juntamente com 16 voluntários saudáveis, selecionados após exclusão laboratorial de doença hepática destes últimos. O parâmetro de RMC mensurando a fração de água extracelular não vascular (FAECnv) foi correlacionado significativamente com o estadio de fibrose na histologia, obtendo coeficiente de correlação de Spearman (r_s) de 0,73, sem sobreposição nos intervalos de confiança de 95% de cada estágio. A fibrose inicial poderia ser distinguida com uma área abaixo da curva (AUROC) de 0,95 (especificidade de 94%; sensibilidade de 87%). Balonização e inflamação lobular também foram significativamente correlacionados com a FAECnv (r_s = 0,65 e 0,52, respectivamente). A esteatose foi significativamente correlacionada com a fração de gordura pela densidade de prótons (r_s = 0,72), e a esteatose inicial pode ser distinguida de voluntários normais com uma

AUROC de 0,98 (limiar de 5%; especificidade de 98%; sensibilidade de 88%). A siderose também foi significativamente correlacionada com $R2^*$ ($r_s = 0,52$). Conclusões: Este estudo valida uma técnica de ressonância magnética multiparamétrica para discriminação precisa de fibrose inicial, inflamação, esteatose e siderose em pacientes com EHNA.

Descritores: Fígado gorduroso; Espectroscopia de ressonância magnética; Cirrose hepática; Hepatopatia gordurosa não alcoólica; Siderose.

ABSTRACT

Leão Filho HM. *Liver multi-parametric magnetic resonance in non-alcoholic fatty liver disease patients* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Background and Aims: non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is one of the main causes of chronic liver disease, closely related to obesity and the metabolic syndrome, posing a significant risk to patients from inflammation and fibrosis. To better diagnose and monitor these patients, imaging modalities are being used to develop non-invasive biomarkers of these pathologies. In this study, we evaluate NASH patients using magnetic resonance imaging (MRI) multi-component relaxometry (MCR), with the goal to validate imaging biomarkers for fibrosis, inflammation, steatosis and siderosis. Results: patients with a NASH diagnosis by needle biopsy (n=106) were prospectively selected for a quantitative MRI exam taking less than 10 minutes, along with 16 healthy volunteers with laboratory exclusion of liver disease. The MCR parameter quantifying the extra-cellular non-vascular water fraction (ECNV_{wf}) was significantly correlated with histology fibrosis staging, with a Spearman’s correlation coefficient (r_s) of 0.73, and no overlap in the 95% confidence intervals of each stage. Initial fibrosis could be distinguished with an AUROC of 0.95 (specificity of 94%; sensitivity of 87%). Ballooning and lobular inflammation were also significantly correlated with ECNV_{wf} ($r_s = 0.65$ and 0.52 , respectively). Steatosis was significantly correlated with the proton density fat fraction ($r_s = 0.72$), and initial steatosis could be distinguished with an AUROC of 0.98 (5% threshold; specificity of 98%; sensitivity of 88%). Siderosis was also significantly correlated with R2* ($r_s = 0.52$). Conclusions: this study validates a multi-parametric MRI technique for accurate discrimination of initial fibrosis, inflammation, steatosis and siderosis in NASH patients.

Descriptors: Fatty liver; Magnetic resonance spectroscopy; Liver cirrhosis; Non-alcoholic fatty liver disease; Siderosis.

1 INTRODUÇÃO

As doenças difusas do fígado são um problema crescente, principalmente pelo aumento de casos de hepatopatia crônica (HC) e cirrose, comprometendo pouco mais de 1,5 bilhões de pessoas no mundo todo em 2017, observando-se aumento de 50% dos casos entre 1990 a 2007 e de 35% entre 2007 a 2017¹. As principais causas são as hepatites virais (B e C), o uso de álcool e a esteato-hepatite não alcoólica, esta última acometendo pouco mais de 890 milhões de pessoas em 2017, com aumento variando entre 83% a 55% no intervalo de 1990-2007 e 2007-2020, respectivamente¹. A mortalidade pela doença também aumentou em cerca de 40,6% no período de 1999-2017 (indo de 6,4 mortes/100.000 habitantes para 8,9 mortes/100.000 habitantes), sendo que este aumento foi de 158% nos pacientes entre 25 a 64 anos², responsável por cerca de 44.000 óbitos apenas nos Estados Unidos da América (EUA) e mais de 2 milhões em todo o mundo³.

Entre etiologias da HC, destaca-se a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), responsável pelo maior número de casos nos EUA atualmente, acometendo cerca de 75 a 100 milhões de indivíduos, acompanhando a prevalência de obesidade neste país, que atinge em torno de 68% da população adulta⁴. Esta tendência também é observada em outros países, particularmente os ocidentais, também acompanhando o

aumento de obesidade, visto que a doença é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica e está frequentemente relacionada a ganho de peso, dislipidemia e resistência à insulina⁵. A prevalência estimada no mundo atualmente é de 24%, com variabilidade entre países, acometendo desde 14% no continente africano até 34% na Ásia, e 30,5% na América do Sul, com cerca de 890 milhões de pacientes acometidos^{1,3}.

A DHGNA é definida por um acúmulo de gordura macrovesicular no fígado igual ou superior a 5%, não associada a consumo anormal de álcool e podendo se apresentar de duas formas: uma conhecida como esteatose simples ou doença gordurosa alcoólica, que raramente evolui para cirrose e exibe um curso mais lento e outra, mais progressiva e conhecida como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), com potencial de progredir para fibrose, cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Recentemente, uma abordagem mais prática e inclusiva sugeriu a nomenclatura de doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (DHGDM)⁶. A definição do DHGDM destaca a importância de sobrepeso/obesidade/excesso de peso e diabetes mellitus como fatores adicionais chave para o fígado esteatótico e a manifestação hepática de um distúrbio multissistema, sendo heterogêneo em seu curso e nos resultados. No entanto, esta nova definição não estratificou todas as etapas de DHGNA, incluindo EHNA e Fibrose.

O uso de métodos de imagem para avaliação da doença difusa do fígado tem evoluído muito nos últimos anos⁷, possibilitando a melhor distinção dos pacientes, selecionando aqueles que podem se beneficiar de

avaliação histológica do parênquima ou mesmo prosseguir com algum tratamento específico⁸. Uma das modalidades com maior crescimento e aceitação é a elastografia (ERM), que pode ser realizada por ultrassonografia (US) ou mesmo ressonância magnética (RM), já testadas em várias etiologias de HC⁹⁻¹¹. Esta técnica possibilita uma análise mais objetiva da fibrose hepática (FH), sendo mais acurada que a avaliação subjetiva por métodos convencionais, normalmente orientada pela alteração morfológica do fígado. Essa melhoria acontece particularmente por aumento da sensibilidade¹², aspecto este mais perceptível na doença gordurosa¹³.

A RM demonstra uma evolução crescente na avaliação destes pacientes, tanto pela quantificação do depósito de gordura (esteatose) e ferro por técnicas de relaxometria convencional ou com desvio químico e correção de fatores de confusão, quanto pela avaliação de fibrose pela elastografia, quantificando principalmente a “rigidez” do fígado. Estes métodos têm sua acurácia validada por múltiplos trabalhos, sendo que a análise objetiva da esteatose é considerada superior ao da patologia convencional por alguns autores^{14,15}. A quantificação de ferro por relaxometria é um método mais indireto que o da esteatose¹⁶, também considerado eficaz, tornando-se uma referência no acompanhamento de alguns pacientes, particularmente aqueles com doenças hematológicas^{17,18}. A elastografia tem se tornado o método padrão na avaliação não invasiva por imagem da fibrose, seja pela elastografia transitória (ET), por ultrassonografia (ARFI ou ShearWave), ou mesmo por RM, exibindo bom desempenho em vários estudos e em diferentes etiologias⁹⁻¹¹. Estes

métodos têm um desempenho melhor quando maior o estadio de fibrose, sendo menos precisas em pacientes com alterações iniciais ou mesmo processos inflamatórios no fígado^{19,20}. Apesar do desfecho considerado mais relevante para a maioria das etiologias de fibrose seja identificar pacientes com doença avançada e/ou cirrose⁷, esse aspecto pode diferir naqueles portadores de DHGNA. Nesses últimos, a presença de inflamação ou mesmo fibrose inicial está relacionada a um prognóstico pior (mortalidade geral ou relacionada ao fígado)^{21,22} e mesmo desenvolvimento mais precoce de carcinoma hepatocelular^{23,24}. Outro benefício é o melhor acompanhamento destes pacientes durante o seu tratamento, podendo ser efetuado objetivamente por estes métodos e permitindo eventuais mudanças na abordagem de forma mais precoce²⁵. Outras limitações da ERM é a presença de sobrecarga férrica concomitante no fígado, prejudicando ou mesmo impedindo a análise, além do alto custo envolvido, derivado da necessidade de um equipamento específico para a geração das ondas de vibração a serem analisadas, tornando sua difusão mais restrita aos centros especializados²⁶.

A proposta deste estudo é avaliar um método não invasivo de RM para avaliação de fibrose e inflamação hepática em pacientes com diagnóstico de EHNA por biópsia, por uma técnica de relaxometria multicompartimental. A ideia é baseada na compartimentalização do sinal do fígado em densidades protônicas distintas, relacionadas a espaços celulares específicos, melhorando a discriminação de fibrose e inflamação, usando sequências disponíveis, sem necessidade de dispositivos externos.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a correlação entre o estadio de fibrose dos pacientes com DHGNA e o componente não vascular da fração de água extracelular (FAECnv).
 - a. Verificar se o tempo entre a biópsia e o exame de RM teve alguma influência nos resultados de correlação.
 - b. Verificar se houve interferência entre a correlação obtida acima com os valores de $R2^{*a}$ do fígado.
2. Avaliar a correlação entre o grau de inflamação lobular e balonização e a FAECnv.
3. Avaliar a correlação entre os valores de esteatose e de sobrecarga férrica do fígado na histologia e os resultados de fração de gordura e $R2^*$ obtidos com a RM, respectivamente.
4. Realizar análise de variabilidade interobservador utilizando subgrupos de pacientes e comparando os resultados obtidos com a RM e com a avaliação histológica.

^a $R2^*$ refere-se à razão de relaxamento $R2^*$, um parâmetro que pode ser calculado pelas sequências adquiridas no estudo e funciona como um substituto ou mesmo biomarcador de depósito de ferro nos tecidos. Quando maior o seu valor, que é medido em s^{-1} , maior o depósito de ferro. Este valor é o inverso do tempo de relaxamento $T2^*$.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho e População

Foram selecionados pacientes com diagnóstico de EHNA por biópsia percutânea, referenciados do Departamento de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), para avaliação prospectiva por RM. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (Anexo A), sendo que todos os pacientes preencheram o Termo de Consentimento de Livre Esclarecimento desenvolvido, antes da realização do exame (Anexo B).

O critério de inclusão era possuir o diagnóstico de EHNA por biópsia realizado pelo menos 6 meses antes do estudo de RM, em pacientes maiores de 18 anos. Todos os pacientes eram direcionados para biópsia percutânea, conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH)²⁷, nas seguintes situações:

1. Suspeita de EHNA e diagnóstico diferencial com outras hepatopatias crônicas.
2. Pacientes com DHGNA e alto risco para EHNA e/ou fibrose avançada, sugerida por teste serológico e/ou elastografia hepática.
3. Pacientes com altos níveis de enzimas hepáticas (TGP/TGO) por mais de 3 meses.

4. Pacientes com síndrome metabólica não controlada com mudança comportamental após 6 meses.

Todas as biópsias foram realizadas no hospital, guiadas por ultrassonografia, utilizando como padrão o lobo direito do fígado, sendo que a localização exata do fragmento não foi possível de ser obtida retrospectivamente pelos arquivos dos pacientes. O intervalo de tempo entre a biópsia e o exame de RM foi escolhido com base na evolução lenta da doença, particularmente em relação ao desenvolvimento de fibrose²⁵, o que provavelmente não prejudicaria a avaliação.

Foram ainda selecionados voluntários para realização do exame de RM, sem histórico de doença hepática prévia e com exames laboratoriais excluindo a possibilidade de hepatopatia, sendo solicitados:

- a. sorologias virais negativas;
- b. valores normais de AST, ALT, Gama GT e α -fetoproteína;
- c. bilirrubina e ferritina normais.

Os pacientes incluídos no estudo eram direcionados para um exame de RM completo, com uso de contraste intravenoso. Os voluntários não utilizaram contraste intravenoso.

3.2 Ressonância Magnética

3.2.1 Aquisição

Os exames foram realizados no mesmo aparelho de RM: Achieva 3T (Philips Medical Systems, Eindhoven, the Netherlands), sendo adquiridas sequências convencionais pré e pós-contraste para avaliação geral dos pacientes. Era necessário um jejum de pelo menos 4 horas antes do exame e cada paciente recebia 0,2 mL/kg de peso de ácido gadotérico - Dotarem® (Guerbet, Villepinte, France) administrado por acesso venoso periférico. Ao exame convencional foram incluídas duas sequências dedicadas de quantificação do parênquima hepático, adquiridas antes do uso do contraste:

1. Sequência *multi-echo gradient echo 2D* (MEGE) com aquisição de 8 tempos de echo igualmente espaçados em intervalos de 1,2 ms (indo de 1,2 ms até 9,6 ms), obtida sem supressão de gordura, com tempo de repetição mínimo (10,9 ms), *flip angle* de 20°, 8 mm de espessura e 0 mm de espaçamento, incluindo todo o parênquima hepático. Esta sequência era adquirida em uma apneia, durando cerca de 15 segundos.
2. Sequência *Multi-echo spin echo T2 2D* (MESE), com aquisição de 10 echos igualmente espaçados em 12 ms (indo de 12 ms até 120 ms), obtida sem supressão de gordura, com tempo de repetição de 3000 ms, *flip angle* de 90°, 8 mm de espessura e 0 mm de espaçamento, também incluindo todo o parênquima hepático. Esta sequência era sincronizada com o ciclo respiratório do paciente, com tempo de aquisição variando entre 4 a 8 minutos, dependente da frequência respiratória.

Os voluntários realizaram o mesmo protocolo, porém sem uso de contraste intravenoso.

3.2.2 Pós-processamento

O pós-processamento das sequências específicas foi realizado por um *software* experimental dedicado: Dive-in® (MagnePath, Perth, Austrália), onde as imagens eram carregadas, sendo posteriormente selecionado o corte transversal do abdome para análise onde se observava a maior área representativa de parênquima hepático e então demarcadas regiões de interesse (RDI) do mesmo. Essas RDI foram realizadas por um radiologista especialista em imagem de abdome com 10 anos de experiência.

3.2.3 Esteatose e ferro

A sequência MEGE foi utilizada para obter valores da densidade protônica da fração de gordura (ou *Proton Density Fat Fraction* - PDFF), expressada em porcentagem na região escolhida. A PDFF é definida como a porcentagem de sinal dos núcleos de hidrogênio derivada da gordura com correção dos fatores de confusão, normalizada em relação a todos os prótons móveis na área de interesse, sendo estes o viés de T1, o decaimento T2* e a complexidade espectral da gordura, além de problemas relacionados a viés de ruído e as *eddy currents*²⁸. Existem duas abordagens disponíveis para a quantificação de gordura por essa abordagem, a análise de magnitude e a complexa. A análise de magnitude é uma abordagem mais simples de se

utilizar em imagens convencionais de RM, corrigindo principalmente o viés de T1^b (pela redução do *flip angle* na aquisição da imagem), o decaimento T2*^c (pela aquisição de múltiplos tempos de eco) e a complexidade espectral dos picos de triglicérides (resolvido através dos dados do trabalho de Hamilton *et al.*²⁹, que demonstrou a distribuição destes picos e sua amplitude relativa em um grupo de pacientes). Por não incluir a informação da *phase*, geralmente a técnica de magnitude sofre mais interferências com a não homogeneidade do campo magnético e geralmente só consegue quantificar valores até 50% de gordura, sem informação prévia ao modelar uma única taxa de relaxamento transversal efetiva (R2*). Esta abordagem muitas vezes é suficiente na grande maioria dos pacientes, pois graus de esteatose acima deste limiar são raramente observados na prática clínica³⁰. A análise complexa envolve o uso dos dados da *phase*, com potencial correção das heterogeneidades do campo e de mensuração de valores entre 0%-100% do espectro de gordura, tendo papel relevante para análise de outros órgãos na cavidade abdominal e no restante do corpo. Apesar das diferenças entre os métodos³¹, ambos demonstram resultados muito semelhantes, podendo ser amplamente usados, inclusive por diferentes plataformas³²⁻³⁵. Neste trabalho utilizou-se uma avaliação baseada no método de magnitude com uma abordagem distinta, que supera a limitação de quantificação, por meio da modelagem de taxas de

^b Viés de T1 se refere à amplificação artificial do sinal de algumas estruturas com tempo T1 curto, como a gordura, quando se usa esta ponderação. Sem a devida correção deste viés, os valores de fração de gordura calculados pela técnica podem ser erroneamente elevados.

^c O decaimento T2* se refere a uma particularidade de qualquer tecido na RM, que pode ser afetada em algumas condições, como o acúmulo de ferro, que determina uma redução (ou encurtamento) deste valor de decaimento. Sem a devida correção, os valores de fração de gordura podem ser erroneamente calculados, particularmente na presença de ferro no tecido de interesse.

relaxamento distintas da água e gordura, permitindo mensurar 0% a 100% do espectro de esteatose, sendo clinicamente semelhante à técnica complexa³⁶. A RDI demarcada seguiu a premissa de incluir a maior área de parênquima hepático em um corte transversal, excluindo apenas os vasos de maior calibre (Figura 1).

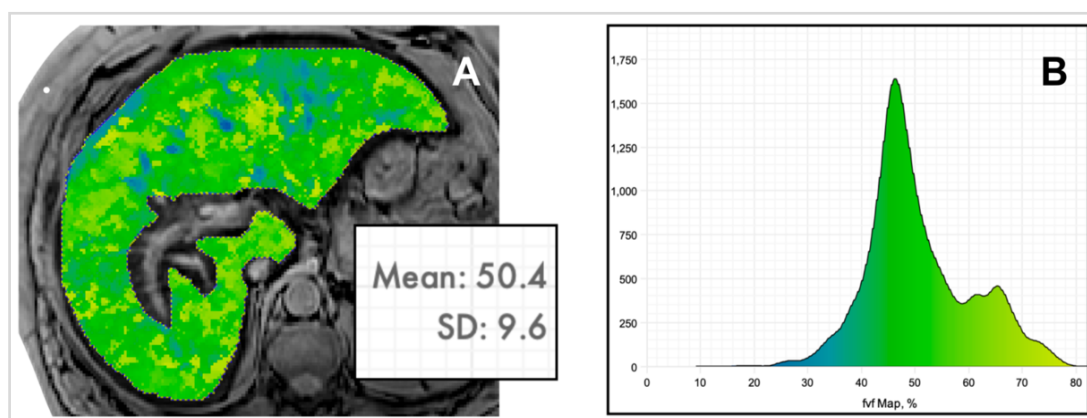


Figura 1 - Exemplo de mapa de PDFF em um paciente do estudo. Em A observa-se o mapa sobreposto ao parênquima hepático, com uma quantificação estimada de 50,4% de fração de gordura. Observar a exclusão dos vasos de maior calibre no lobo hepático direito e a quantificação acima de 50%, mesmo pela análise magnitude. Em B podemos constatar a distribuição dos píxeis da fração de gordura representados em A

A mensuração da razão de relaxamento $R2^*$ seguiu a mesma premissa da avaliação da PDFF, sendo este parâmetro obtido espontaneamente pela análise de magnitude, visto que é considerado como fator de confusão para o cálculo da esteatose. Logo, no cálculo da PDFF, um dos resultados obtidos é o valor do $R2^*$ da água, livre do viés do relaxamento da gordura, como um substituto para a sobrecarga de ferro no fígado, mais preciso que os valores obtidos por relaxometria convencional³⁷. A RDI foi obtida da mesma forma (Figura 2).

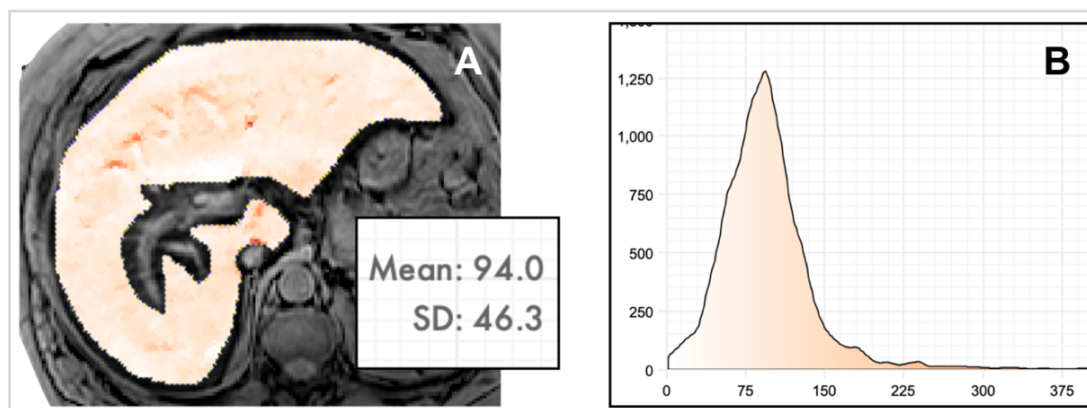


Figura 2 - Exemplo de mapa de R2* da água livre em um paciente do estudo. Em A observa-se o mapa sobreposto ao parênquima hepático, com uma quantificação estimada de R2* da água livre de 94,0 s⁻¹. Observar a exclusão dos vasos de maior calibre no lobo hepático direito. Em B pode-se constatar a distribuição dos pixels do mapa de R2* representados em A

3.2.4 Fibrose

O pós-processamento da sequência MESE é o ponto principal do trabalho sendo feito por relaxometria de multicomponente (RMC), decorrente da observação prévia de que a análise de sinal de T2 biexponencial para quantificação de ferro no fígado, identificou compartimentos de água intra e extracelulares³⁸. Essa abordagem pretende resolver a complexidade estrutural do parênquima hepático, particularmente quando várias alterações estão associadas, como no caso da EHNA. O objetivo deste estudo é identificar em cada voxel o decaimento particular do sinal de RM em água ou gordura, ou mesmo no espaço intra, ou extracelular. Ao isolar essas fontes de sinais, pode-se modelar mais precisamente o decaimento de sinal e obter parâmetros de RM distintos que oferecem uma gama maior de biomarcadores potenciais.

A abordagem de compartimentalizar o fígado é fundamentada pela evidência do acúmulo de proteínas e expansão progressiva do espaço extracelular deste órgão na fibrose em várias etiologias³⁹⁻⁴¹, já documentado com outras técnicas de relaxometria e mesmo com uso de contraste por outros autores⁴²⁻⁴⁷. Esta abordagem consistiu no emparelhamento da sequência MEGE com dois componentes (a porcentagem de gordura e o valor de R2)*, junto com a sequência MESE usando um modelo de três componentes, um para a gordura e dois para “acúmulos” de água nos espaços intra e extracelular.

O método matemático para se obter os resultados na RMC é complexo, sendo válida uma breve discussão do mesmo. Em contraste com a relaxometria convencional, que se baseia na avaliação de dois componentes desconhecidos: a razão de relaxamento do sinal e a amplitude inicial do mesmo, a análise multicompartimental exibe um grau de complexidade mais elevado, com a adição de mais um parâmetro desconhecido, visto que se está separando o decaimento exponencial global em mais de uma razão de relaxamento. O objetivo é encontrar a função que se encaixe mais perfeitamente nos dados de sinal obtidos nas imagens, buscando a menor diferença entre os mesmos, ou o melhor ajuste da curva, mais difícil no modelo proposto, pois o grau de liberdade matemático permite o ajuste errado em uma gama de possibilidades (Figura 3). Geralmente o método matemático mais utilizado para essa análise na literatura é o Algoritmo de Levenberg-Marquardt (ALM)^{48,49}. A proposta deste estudo se baseia numa metodologia original, derivada da técnica de “recozimento

simulado simples” (*simplex simulated annealing*), buscando mais rápida e efetivamente o menor ponto de conversão para a função em relação aos dados obtidos. Uma maneira de se avaliar o desempenho de cada um dos métodos é usando um modelo sintético para tentar caracterizar as duas origens de sinais dominantes num tecido, um de decaimento rápido que representaria a água ligada a uma macromolécula de interesse e o outro mais lento, que representaria a água livre. No caso, a caracterização do primeiro componente é o objetivo principal, visando avaliar um substituto para a quantificação de concentração da macromolécula. Para isso os “testes” desenvolvidos são mapas de amplo espectro para os valores possíveis (Figura 4), com três dos quatro parâmetros conhecidos, mantendo-se o nível de sinal inicial constante nesta análise. A partir dos mapas, utilizou-se o modelo de decaimento de sinal e os conectou com os valores dos parâmetros em determinado local de píxel e tempo de medição escolhido, sendo posteriormente adicionado o ruído (2%) para tornar as imagens sintéticas o mais próximo possível do adquirido pela RM. A Figura 5 mostra como as imagens sintéticas se manifestariam na RM em uma aquisição de nove tempos de echo, sendo que quanto maior o TE, menor o sinal. Em seguida, na mesma figura se vê como o ajuste da curva se manifesta usando a técnica convencional de sinal obtida pelo ALM em comparação com o método proposto no estudo atual, que demonstra um desempenho superior.

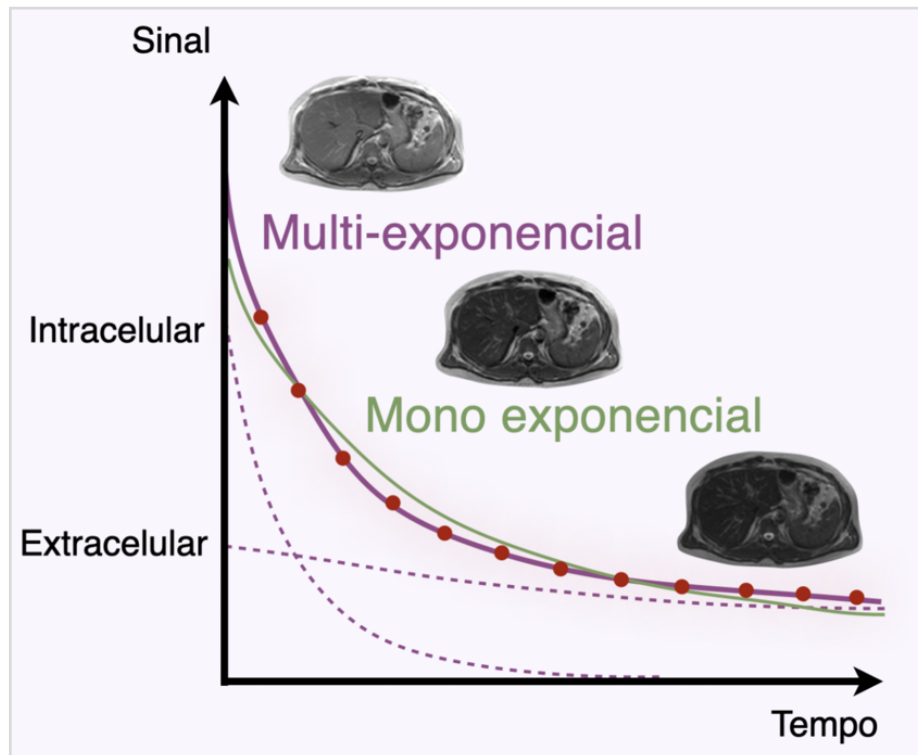


Figura 3 - Análise multiexponencial do relaxamento R2 no parênquima hepático. Em vermelho, vê-se o sinal observado em cada um dos TEs adquiridos na imagem fonte. Usando a técnica convencional de regressão monoexponencial, o ajuste da curva é pouco preciso, como se pode perceber pela distância entre a linha verde e os pontos obtidos. Usando a abordagem multiexponencial de regressão, é possível descrever dois compartimentos no decaimento, como o intra e extracelulares, tornando o ajuste mais adequado e separando os dois componentes, como na curva roxa

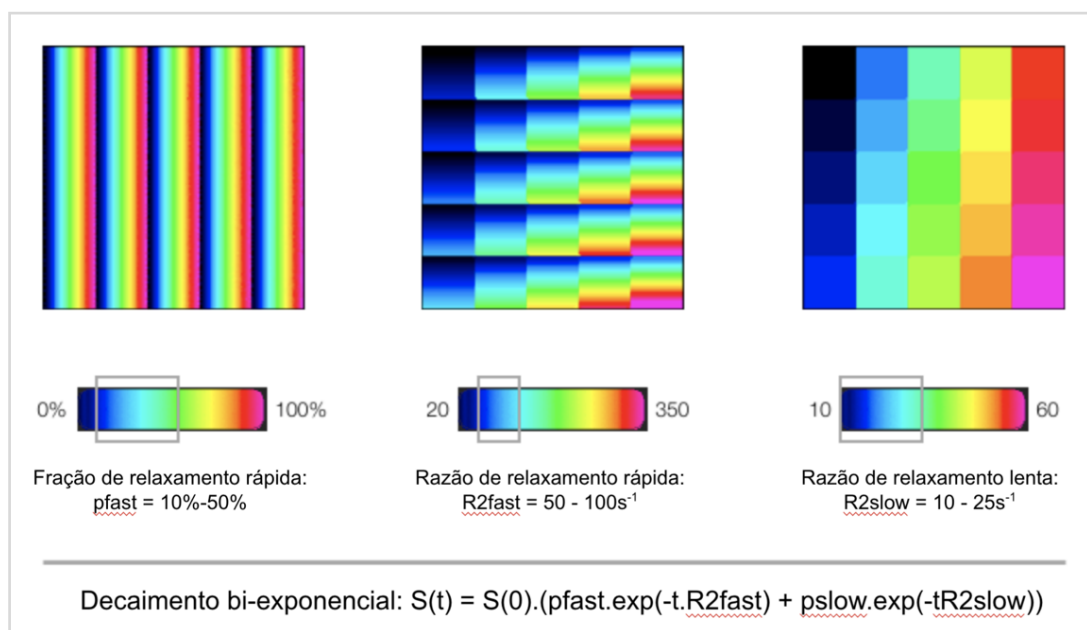


Figura 4 - Três “padrões de teste”: mapas de um amplo espectro de valores de parâmetros possíveis. Há mapas para apenas três dos quatro parâmetros desconhecidos neste modelo de sinal, pois o nível do sinal inicial pode ser mantido constante para fins de teste. O primeiro é um mapa de valores rápidos, que é a quantidade percentual do sinal da água ligada à macromolécula. O segundo é um mapa de valores de $R2_{fast}$, a taxa de relaxamento característica para as moléculas de água “ligadas”. O terceiro é um mapa de valores de $R2_{slow}$, a taxa de relaxamento característica para as moléculas de água “não ligadas”. Nas escalas de cores para cada mapa, a faixa de valores em janelas em cinza é a faixa de valores esperados tanto no tecido saudável quanto no doente. Na verdade, testou-se uma faixa de valores mais ampla do que essa para garantir que há cobertura suficiente para isolar esses valores

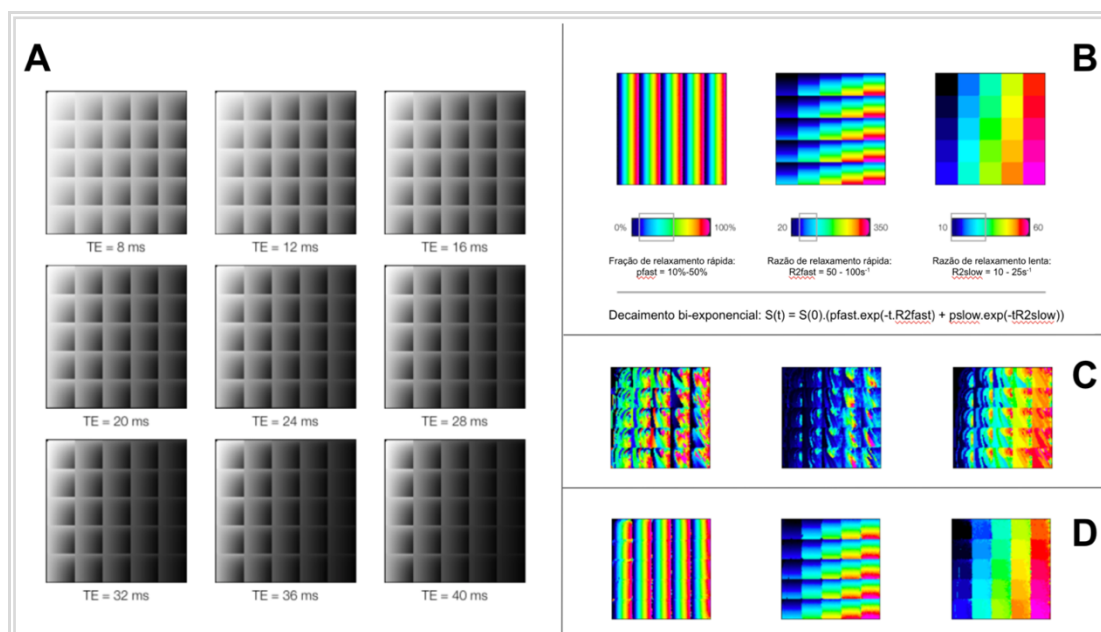


Figura 5 - A) imagens sintéticas da Figura 4 que aparecem nos 9 tempos de aquisição de imagem diferentes, normalmente adquiridas em um aparelho de ressonância magnética. Quanto mais tempo o tempo de medição, menos sinal que foi medido. **C)** o ajuste das imagens usando o pós-processamento habitual pelo ALM - verificar a diferença do resultado com os dados iniciais, demonstrados em **B**. **D)** resultado do ajuste usando a técnica desenvolvida para a RMC do trabalho

Os resultados iniciais desta técnica foram animadores (Figura 6), porém os vasos hepáticos e do sistema venoso portal ainda eram destacados no parênquima⁵⁰, o que criava um problema de segmentação manual da RDI, no intuito de se excluir os mesmos da amostra. Desta forma progrediu-se para um modelo de sinal com quatro componentes: um para gordura e três para água, segmentando o compartimento extracelular em vascular e não vascular, o último referido como o espaço perisinusoidal (ou o espaço de Disse), onde a fibrogênese hepática é conhecida por originar^{51,52}. Este último compartimento era o principal objetivo de avaliação sendo denominado componente não vascular da fração de água extracelular (FAECnv) (Figura 7).

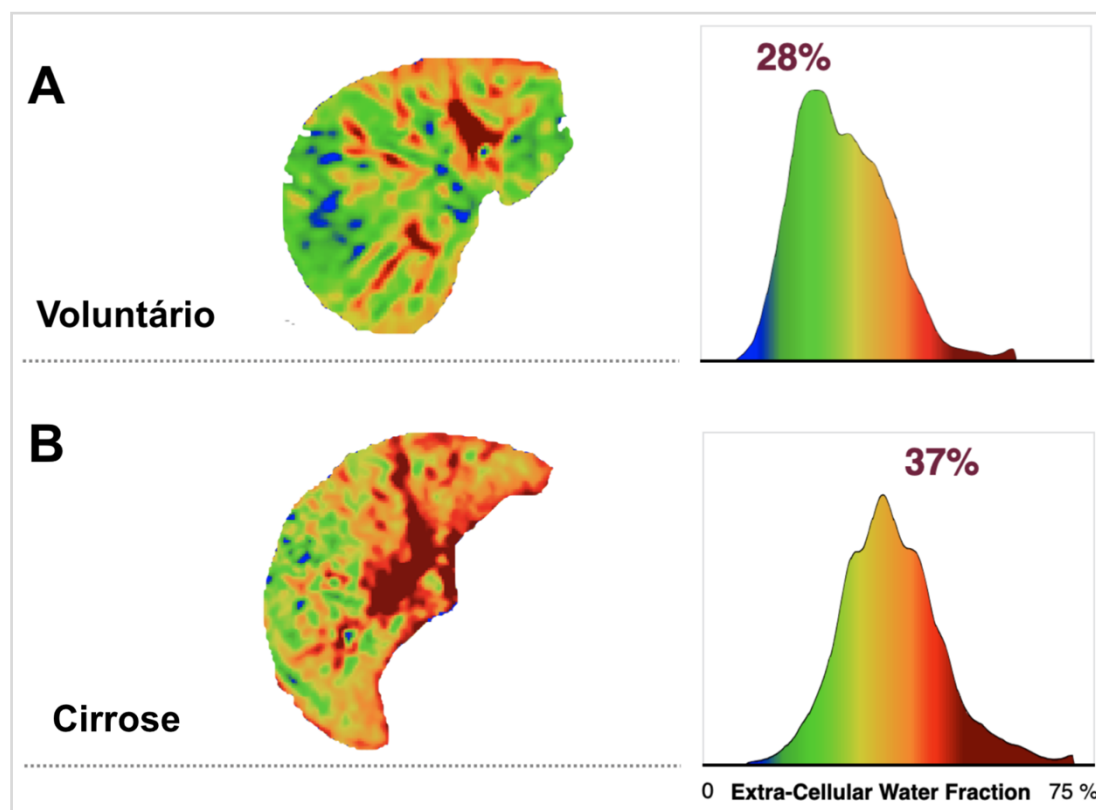


Figura 6 - Exemplo dos mapas de fração de água extracelular (FAEC) iniciais. Apesar de se poder identificar uma nítida diferença entre os extremos de um voluntário sem doença hepática e um paciente com cirrose, com expansão da FAEC neste último em B, pode-se notar a nítida interferência dos vasos hepáticos na imagem, como áreas mais vermelhas em destaque. Isto poderia trazer um prejuízo na análise e reprodutibilidade do método, devido à necessidade de se excluir manualmente estas estruturas

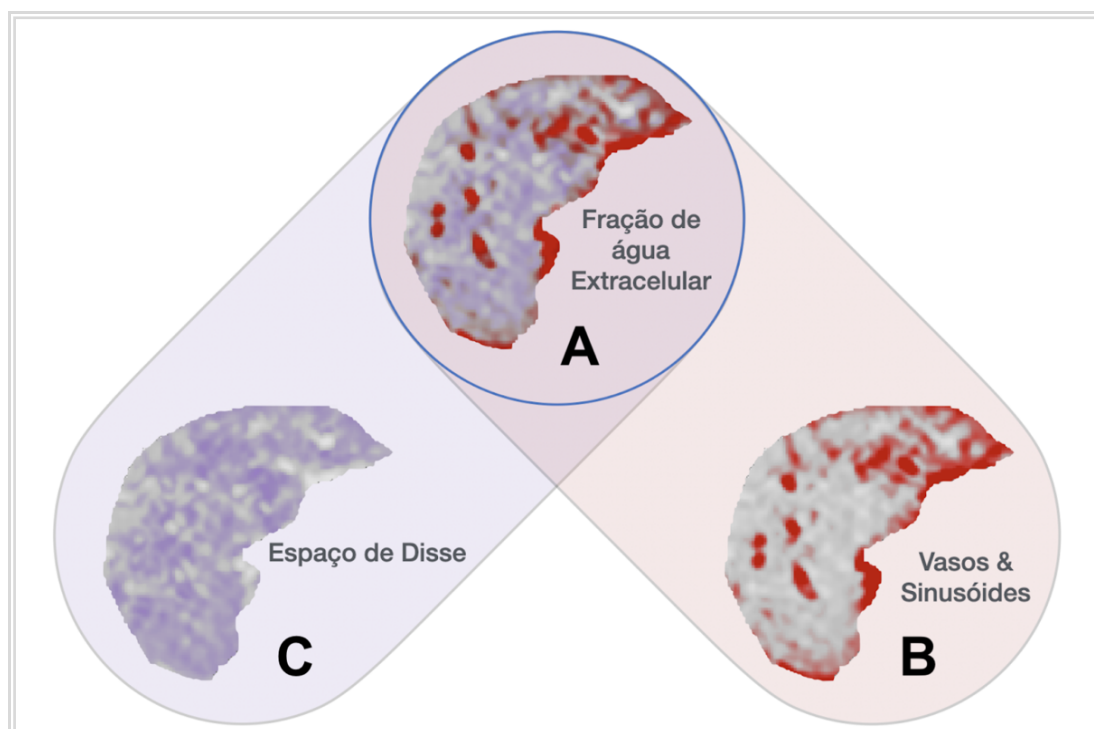


Figura 7 - Progressão dos mapas de fração de água extracelular. A) mapa original de FAEC global, incluindo os componentes vascular e não vascular, conforme descrito na Figura 6. Após a segmentação automática, obteve-se dois mapas, o mapa do componente vascular de FAEC, representado por vasos e sinusóides em B e o mapa do componente não vascular de FAECnv em C, sendo o principal parâmetro utilizado no projeto e denominado na imagem como “espaço de Disse”

A análise inicial era realizada após um algoritmo de correção de artefato respiratório⁵³ e da exclusão do primeiro tempo de eco T2 adquirido, devido a efeitos de estimulação de eco⁵⁴. A demarcação das RDIs seguiu o mesmo modelo descrito para a quantificação da esteatose, porém sem excluir os vasos da amostra. Para esta análise é necessário incluir a fração de gordura obtida com o processamento da sequência MEGE. Foi ainda utilizada uma RDI circular colocada subjetivamente na porção lateral do lobo hepático direito, com área variando entre 2 cm² a 5 cm². Esta RDI foi utilizada numa tentativa de se aproximar da área de biópsia (Figura 8).

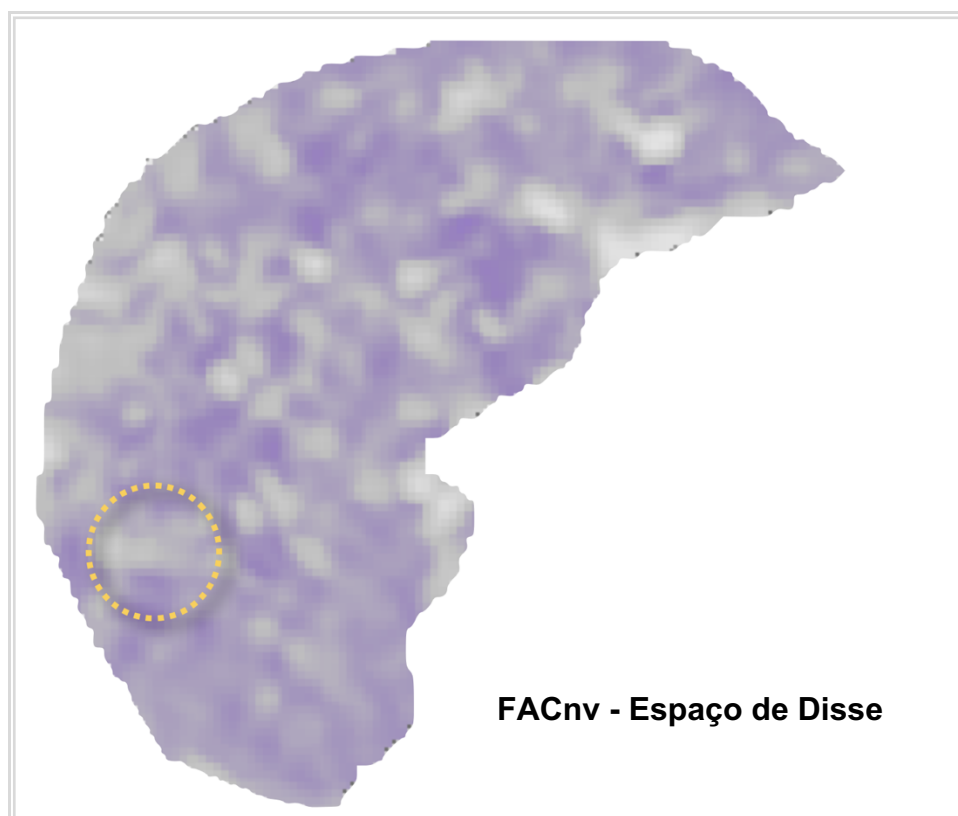


Figura 8 - Regiões de interesse utilizadas para se avaliar correlação entre a FAECnv e o estadio de fibrose. Foi utilizada toda a área do fígado (mapa colorido em roxo) e uma RDI circular em amarelo, posicionada na periferia do lobo hepático direito

3.2.5 Variabilidade interobservador

Uma amostra de 26% da população foi aleatoriamente determinada, para determinar a variabilidade interobservador. Essa amostra foi ajustada para incluir proporções iguais de pacientes com diferentes graus de fibrose, sendo feita por um radiologista abdominal com 1 ano de experiência em imagem abdominal, sem saber dos resultados da primeira análise. Só foram realizadas as RDIs incluindo a área total do fígado em cada corte transversal.

Nenhum dos radiologistas responsáveis pela análise tinha conhecimento do resultado da biópsia dos pacientes durante a leitura.

3.3 Patologia

A análise das lâminas de biópsia foi realizada por uma patologista especialista na avaliação hepática, com 13 anos de experiência. Foi realizada a revisão de todas as lâminas previamente preparadas para o diagnóstico inicial da biópsia. As análises foram feitas de forma convencional com quantificação subjetiva.

Os fragmentos de tecido hepático analisados foram fixados em formalina a 4% e submetidos a colorações hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson, Picrosírios vermelho, Perls para pigmentos e impregnação com Sais de Prata (Reticulina). Foi utilizado o sistema de classificação histológica EHNA CRN (esteatose 0-3, inflamação lobular 0-3, balonização hepatocelular 0-2, fibrose 0-4)^{55,56} A classificação de ferro foi dada em cinco estágios, dos graus 0 a 4, segundo a coloração de Perls, sendo relatado qual o local de depósito, se hepatocelular, no sistema reticuloendotelial (SRE) ou portal. A classificação HPC foi realizada segundo a classificação de Scheuer *et al.*⁵⁷ sendo que nos outros compartimentos foi dividida em intensidades subjetivas de 0 a 4. A esteatose foi quantificada subjetivamente pela coloração HE em porcentagem, múltiplas de 10, para melhor comparação com os resultados de RM.

Caso alguma lâmina estivesse ausente ou descorada, o bloco de parafina original era buscado retrospectivamente e realizadas outras colorações para melhor avaliação. A patologista realizou a análise sem o conhecimento dos dados de RM ou da análise inicial.

Dado que foi utilizado apenas um patologista para revisar as biópsias hepáticas, foi utilizada uma amostra de 63% das mesmas para correlação com os resultados das leituras iniciais (prospectivas), feitas pelo serviço.

3.4 Desfechos e análise estatística

O tamanho da amostra necessária para a coorte de pacientes foi calculado usando uma abordagem proporcional, buscando diferenciar a fibrose de indivíduos normais. Como tal, foi utilizado um teste unicaudal, visando uma especificidade e sensibilidade de 95%, com α de 0,05 e uma poder de teste de 0,95, respectivamente. As taxas de prevalência de fibrose em pacientes com DHGNA e EHNA na população brasileira foram retiradas de dados demográficos recentes⁵⁸⁻⁶⁰. Aplicando estes parâmetros e uma proporção esperada de 0,2, o tamanho da amostra foi determinado, necessitando de 95 pacientes com fibrose e 19 indivíduos normais, considerando uma taxa de desistência de 2%⁶¹.

Da mesma forma, o tamanho da subamostra para avaliar a variabilidade interobservador da análise radiológica foi determinado com parâmetros estatísticos correspondentes, com base na medida do RMC com as médias relativas mais próximas entre voluntários e pacientes com EHNA por desvio padrão.

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva resultando em tabelas de frequência para variáveis qualitativas; as estatísticas de tendência central e de dispersão foram calculadas para as variáveis quantitativas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis analisadas e o coeficiente de correlação de postos de Spearman (r_s) foi utilizado para avaliar a correlação não paramétrica dos parâmetros da MR com a avaliação histológica. Para estudar a associação entre as variáveis contínuas e o estadio de fibrose foram utilizadas as estratégias de análise de variância ANOVA de uma via com comparação múltipla de Bonferroni no caso de distribuição normal. Para lidar com as distribuições assimétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com valores significativos ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes. A importância do coeficiente de correlação: correlação foi considerada conforme a regra prática de Mukaka⁶² como: desprezível (0,0 a 0,30); baixa (0,30 a 0,50); moderada (0,50 a 0,70); alta (0,70 a 0,90); e muito alta (0,90 a 1,00).

A curva característica de operação do receptor (ROC) foi utilizada para análise diagnóstica da variável FAECnv em relação a várias estratificações de Estadio de Fibrose. A estratégia para escolha do ponto de corte foi realizada com base no maior resultado do índice de Youden; valores de acurácia incluindo intervalos de confiança, sensibilidade, especificidade foram calculados para o melhor ponto de corte.

Todos os testes realizados consideraram um α bidirecional de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95% sendo realizados com apoio computacional dos *softwares* IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 25) e Excel 2010[®] (Microsoft Office).

4 RESULTADOS

Entre agosto de 2013 e maio de 2017 foram selecionados 115 pacientes que tinham uma biópsia diagnóstica de EHNA na janela temporal de 6 meses para realização do exame de imagem. O exame de RM foi finalizado em 113 pacientes, sendo que dois deles não conseguiram realizar, um por claustrofobia (0,9%) e o outro por ter a estrutura corporal incompatível com o *gantry* do aparelho. O restante dos pacientes conseguiu realizar o exame, sendo que em um houve falha técnica no processamento do mapa de fibrose, (falha em 0,9%). Os demais resultados do exame foram satisfatórios.

Dos 112 pacientes remanescentes, a revisão da biópsia levou a exclusão de 6 pacientes por problemas do tamanho da amostra (2); perda da amostra (1); presença de granuloma portal (1); e suspeita de outra etiologia (2). Logo a população final foi de 106 pacientes com EHNA e 16 voluntários sem doença hepática (Figura 9).

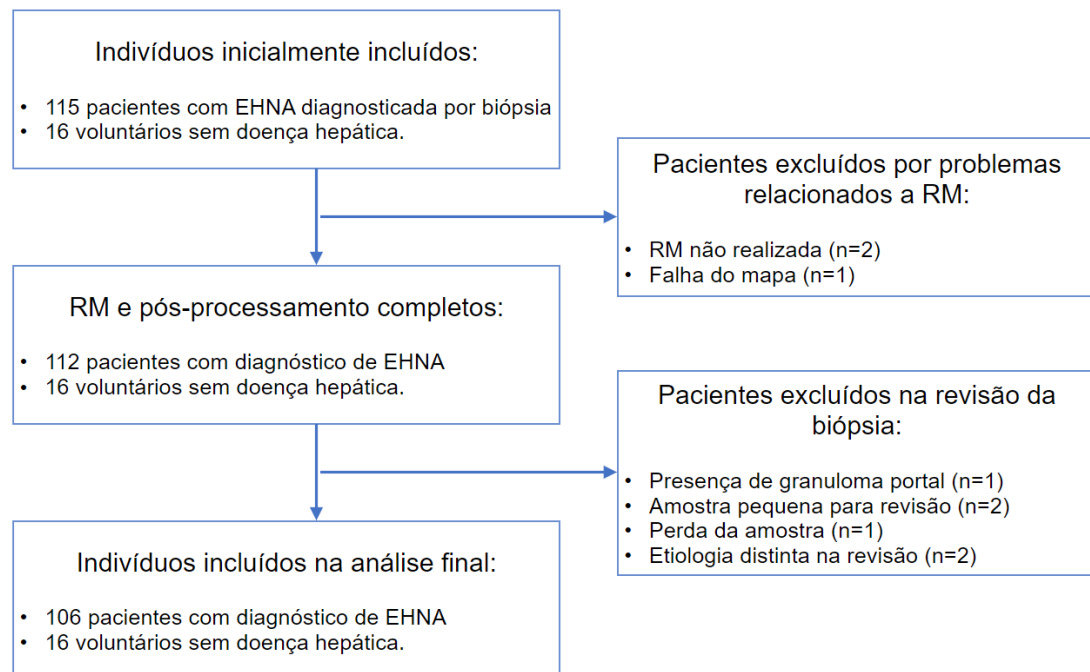


Figura 9 - Fluxograma de seleção dos pacientes e voluntários

Dentre os pacientes incluídos no estudo, 38 eram do sexo masculino (36%), com média de idade de $50,5 \pm 11,4$ anos e IMC de $30,1 \pm 4,9$ kg/m². A distribuição dos pacientes conforme o estadió de fibrose foi de 13% com F0 (voluntários), 25% com F1, 17% com F2, 37% com F3 e 8% com F4 (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos de base e características histológicas dos indivíduos

Característica	Pacientes com RM (n = 122) e biópsia pareada (n = 106)	
Pacientes com EHNA	106	
Feminino (%)	68	(55,7)
Idade (anos), média (DP)	50,5	(11,4)
IMC (kg/m ²), média (DP)	30,1	(4,9)
Altura (m), média (DP)	1,63	(0,11)
Voluntários	16	
Feminino (%)	8	(43,8)
Idade (anos), média (DP)	33,6	(6,2)
IMC (kg/m ²), média (DP)	23,0	(2,7)
Altura (m), média (DP)	1,71	(0,12)
Histologia (pacientes)		
Fibrose (%)		
0	1	(0,9)
1	29	(27,4)
2	21	(19,8)
3	45	(42,5)
4	10	(9,4)
Inflamação lobular (%)		
0	0	(0)
1	43	(40,6)
2	56	(52,8)
3	7	(6,6)
Balonização (%)		
0	4	(3,8)
1	47	(44,3)
2	55	(51,9)
Esteatose (%)		
0	1	(0,9)
1	18	(17,0)
2	39	(36,8)
3	48	(45,3)
Siderose (%)		
0	50	(47,2)
1	35	(33,0)
2	17	(16,0)
3	4	(3,8)

4.1 Estadio de Fibrose

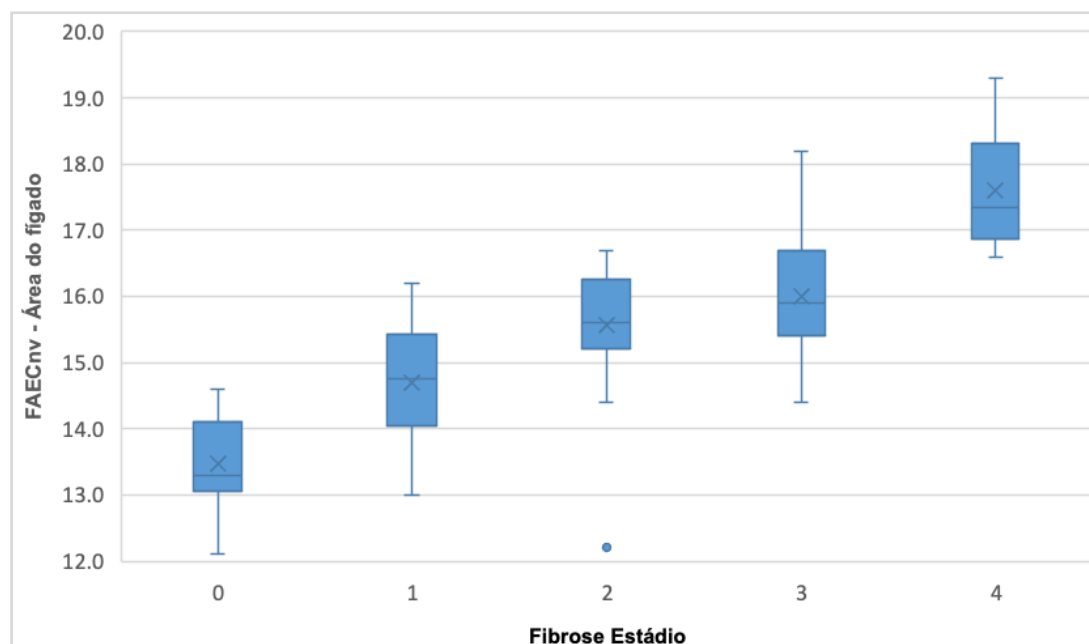
A variável FAECnv, demonstrou uma distribuição normal, exibindo média de 15,58 e desvio padrão de 1,52, com a análise de variância (ANOVA) mostrando uma diferença significativa das médias da variável em cada grupo ($p < 0,001$). A mesma está significativamente correlacionada com o estadio da fibrose, com coeficiente r_s de 0,73 ($p < 0,001$) usando a área total do fígado, destacando-se que os intervalos de confiança de 95% não demonstraram sobreposição dos valores entre os grupos de pacientes (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação à fibrose incluindo a área total do fígado e o RDI circular, mais correlações gerais

RM versus histologia		Estatística geral		Intervalo de confiança 95%		ANOVA	CC
Parâmetro da RMC	Histologia	Média	DP	Limite inferior	Limite superior	P valor	r_s
FAECnv (%): Área do Fígado	Fibrose:					< 0,001	0,73
	0	13,5	0,7	13,1	13,8		
	1	14,7	0,9	14,4	15,0		
	2	15,6	1,0	15,1	16,0		
	3	16,5	1,0	16,2	16,8		
FAECnv (%): RDI circular	Fibrose:					< 0,001	0,80
	0	13,1	0,7	12,8	13,6		
	1	14,8	0,8	14,5	15,1		
	2	15,6	1,0	15,1	16,0		
	3	16,5	1,0	16,2	16,8		
	4	18,2	0,7	17,7	18,6		

Observar que os intervalos de confiança de 95% para os resultados não demonstram sobreposição de valores.

Gráfico 1 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM usando a área total do fígado e o estágio da fibrose da histologia



As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. "x" corresponde as médias dos valores e "o" a valores atípicos. O parâmetro possibilitou uma distinção estatisticamente significativa entre todos os estádios de fibrose.

Foram avaliados os pontos de corte para se distinguir os estádios de fibrose dos pacientes baseados na variável descrita acima. Para identificar voluntários (F0) daqueles com qualquer nível de fibrose (F1-F4), o ponto de corte encontrado foi de 14,5% com área abaixo da curva de característica de operação do receptor (AUROC) de 0,95 (IC95%: 0,906-0,984), com uma sensibilidade (sens.) de 87% e uma especificidade (esp.) de 94%. Na distinção entre apenas voluntários (F0) e aqueles com fibrose inicial (F1), a AUROC foi de 0,85 (IC95%: 0,730-0,951), com sens. de 77% e esp. de 83% e ponto de corte de 14,1%.

Nas demais estratificações de fibrose, os resultados foram:

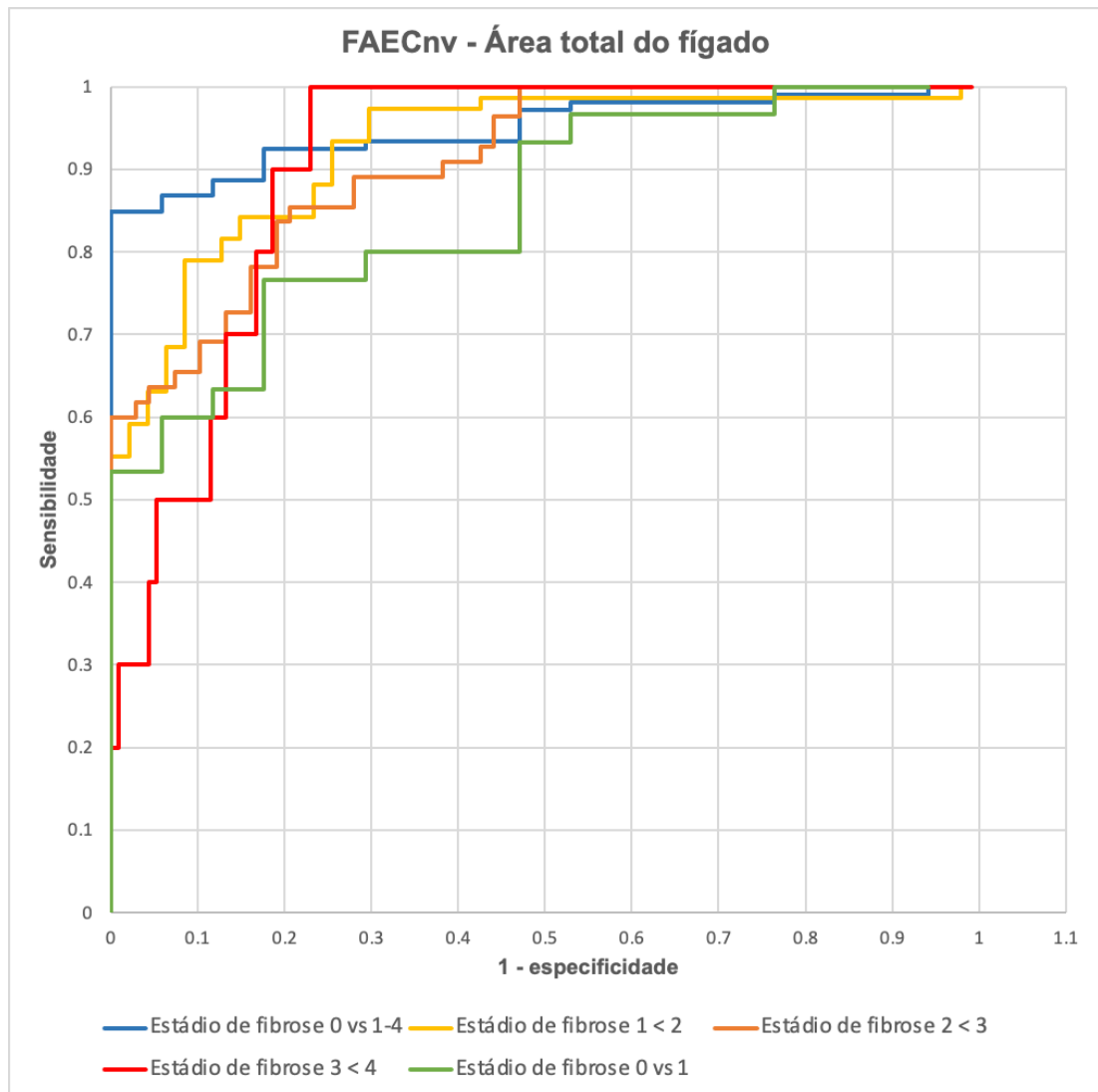
- <1 vs. > 2 AUROC: 0,925 (IC95%: 0,872-0,967); sens. 78,9% esp. 91,5%.
- <2 vs. > 3 AUROC: 0,908 (IC95%: 0,851-0,953); sens. 76,3% esp. 83,8%.
- <3 vs. > 4 AUROC: 0,906 (IC95%: 0,836-0,965); sens. 90% esp. 81,5%.

Estes dados estão descritos na Tabela 3 e também no Gráfico 2. A representação gráfica dos mapas da variável está na Figura 10.

Tabela 3 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro FAECnv de RMC em relação às classificações histológicas, usando a área total do fígado e a RDI circular

Parâmetro da RMC	Histologia	Ponto de corte	AUROC	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
FAECnv (%):	Fibrose:				
Área do Fígado	F0 vs. F1-F4	14,5	0,948	94,1	86,8
	F0-F1 vs. F2-F4	15,6	0,925	91,5	78,9
	F0-F2 vs. F3-F4	15,9	0,908	83,8	76,3
	F0-F3 vs. F4	16,8	0,906	81,5	90,0
	F0 vs. F1	14,1	0,853	83,4	76,7
FAECnv (%):	Fibrose:				
RDI circular	F0 vs. F1-F4	14,1	0,976	94,1	92,4
	F0-F1 vs. F2-F4	15,3	0,913	81,8	84,2
	F0-F2 vs. F3-F4	15,8	0,893	81,8	74,5
	F0-F3 vs. F4	17,0	0,962	87,6	100,0
	F0 vs. F1	13,9	0,947	88,2	93,3

Gráfico 2 - Curvas ROC para distinção dos estágios de fibrose em relação ao parâmetro FAECnv usando a área total do fígado



Observar que além das comparações usuais, foi incluída a distinção entre os voluntários (F0) e pacientes com fibrose F1 (curva verde clara).

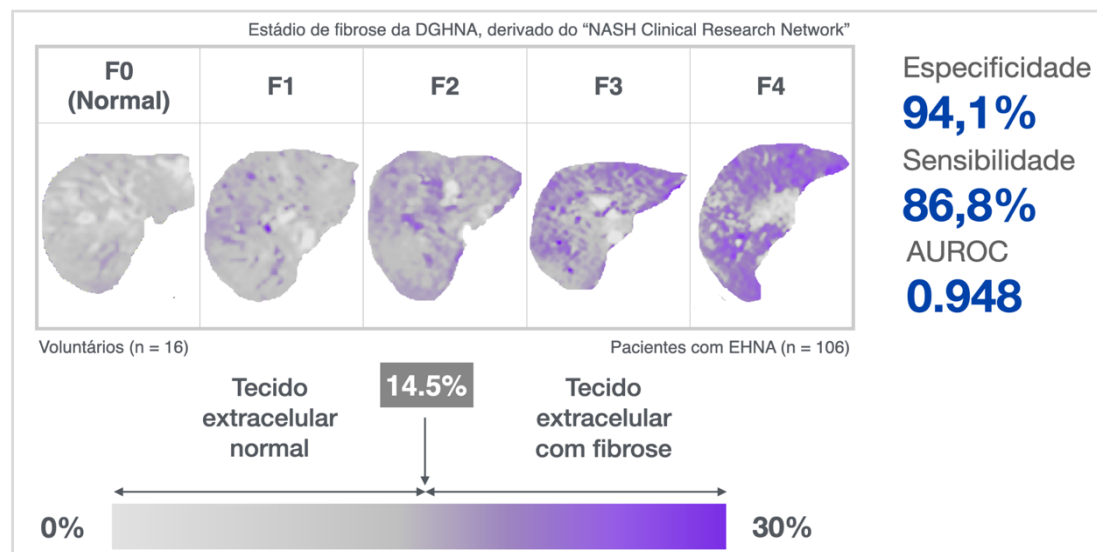
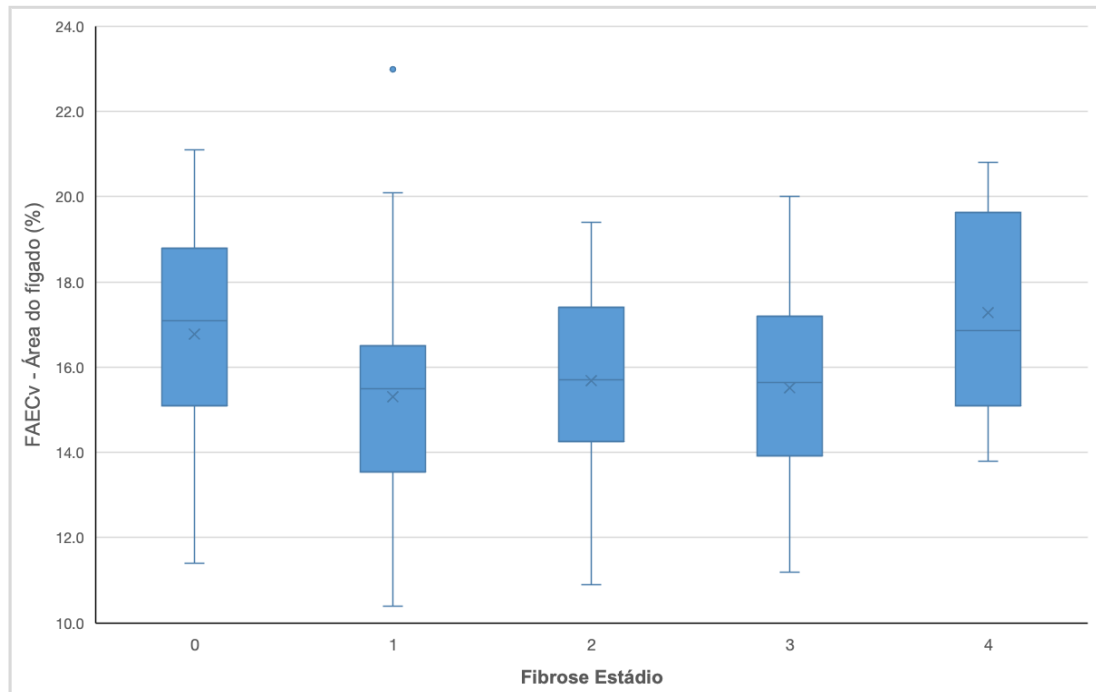


Figura 10 - Representação gráfica dos mapas de FaECnv (propostos como um biomarcador de fibrose) com cores no espectro de classificação histológica proposto pela NAS-CRN. O ponto de corte destacado é aquele obtido para diferenciar voluntários dos demais com algum estádío de fibrose, usando a área do fígado como referência. Os valores de sensibilidade, especificidade e AUROC estão representados ao lado

A fração de água extracelular vascular (FAECv) não mostrou nenhuma correlação com fibrose para a área transversal do fígado, $r_s = 0,002$ (Gráfico 3), e nenhuma diferença significativa entre os grupos de fibrose, com a média \pm DP para FAECv de $15,8 \pm 2,5\%$. Da mesma forma, não houve correlação entre a FAECv e a FAECnv, $r_s = -0,012$. De maneira esperada, a fração de água extracelular (FAEC) foi vinculada aos resultados de FAECv e FAECnv, com uma correlação pior com a fibrose do que a última, $r_s = 0,42$ ($p < 0,001$). A correlação entre o estádío de fibrose e as variáveis descritas pode ser observada na Figura 11.

Gráfico 3 - Correlação entre o parâmetro FAECv da RM, como um substituto para o corpo vascular extracelular, usando a área total do fígado e o estágio da fibrose da histologia



As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. "x" corresponde as médias dos valores e "o" a valores atípicos. Observar que não existe correlação entre o parâmetro, que corresponde ao componente vascular extracelular e o estágio da fibrose, tampouco distinção significativa entre os grupos de fibrose.

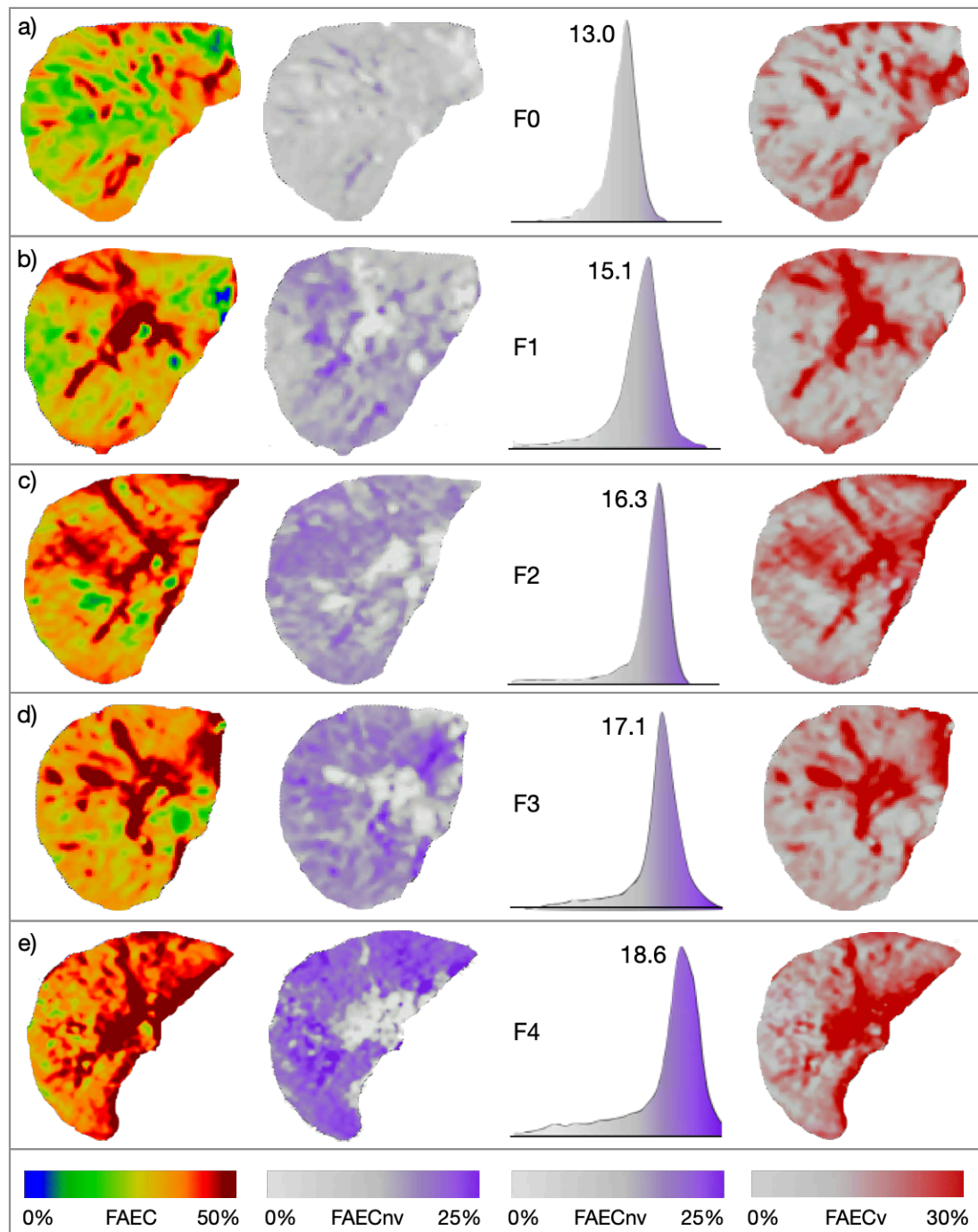


Figura 11 - Mapas de fração de água extracelular para cinco indivíduos com diferentes estágios de fibrose: painéis a) a e) demonstrando o aumento no estágio da fibrose de F0 a F4, respectivamente. Cada painel, da esquerda para a direita, mostra os mapas das frações de água extracelular total (FAEC), de água extracelular não vascular (FAECnv) com a distribuição dos pixels dos mesmos e de água extracelular vascular (FAECv). O valor médio para FAECnv (%) para cada secção transversal do fígado é descrito junto ao pico das suas respectivas distribuições e pode-se ver seu desvio para a direita com o aumento do estágio da fibrose. Ao mesmo tempo, vê-se que os mapas de FAECv não se modificam com o aumento da fibrose

A análise da FAECnv com a RDI circular (FAECnvC) teve um desempenho semelhante ao uso da área total do fígado, com uma distribuição normal com média de 15,62 e desvio padrão de 1,61. A correlação com o estadio da fibrose mostrou um coeficiente r_s de 0,80 (valor de $p < 0.001$). Pela natureza distinta das variáveis vai-se novamente recorrer a um modelo de análise de variância para compreender o comportamento das médias de FAECnvC conforme o estadio da fibrose.

As variâncias de FAECnvC são homogêneas entre os grupos de estadios de fibrose (valor de $p = 0,218$), sendo as médias heterogêneas entre os grupos (valor de $p < 0,001$). As comparações múltiplas apontam diferença significativas em todos os estadios. Esses resultados podem ser verificados na Tabela 2 e na Gráfico 4, bastante semelhantes aos do uso da área total do fígado.

Foram obtidos os pontos de corte para se distinguir os estadios de fibrose baseados na variável FAECnvC, sendo que para identificar voluntários (F0) daqueles com qualquer nível de fibrose (F1-F4), o valor encontrado foi de 14,1% com área abaixo da curva de característica de operação do receptor (AUROC) de 0,976, com sens. de 92,4% e esp. de 92,4%. Na distinção entre voluntários (F0) e fibrose inicial (F1), a AUROC foi de 0,95, com sens. de 93,3% e esp. de 88,2%, exibindo ponto de corte de 13,9%.

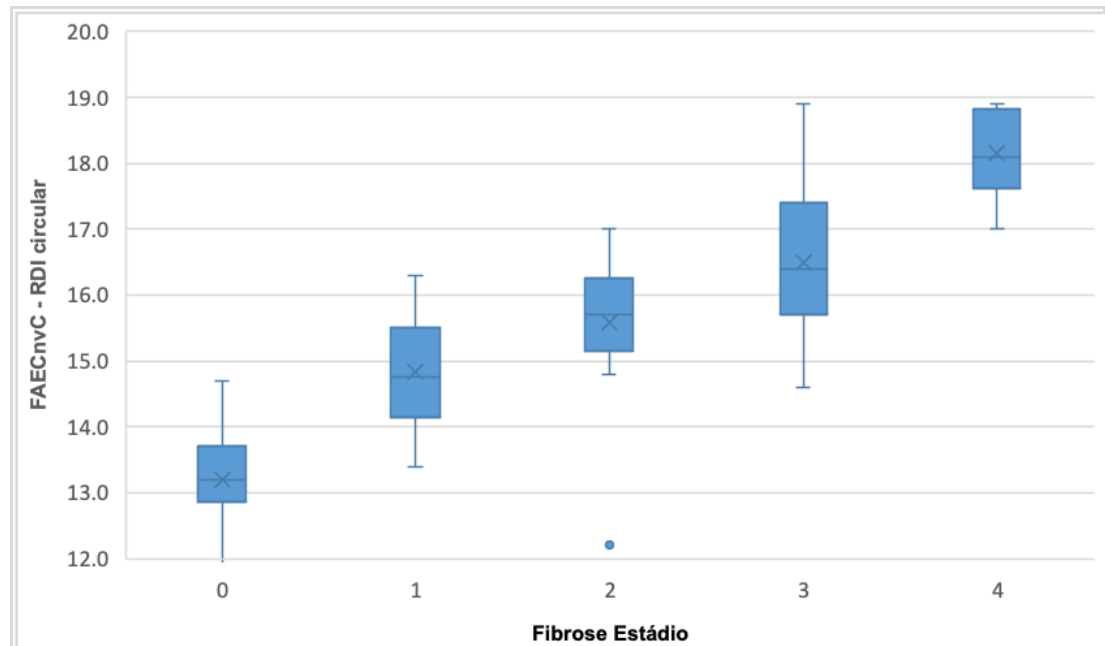
Nas demais estratificações de fibrose, os resultados foram:

- <1 vs. > 2 AUROC: 0,913; sens. 84,2% esp. 81,8%.
- <2 vs. > 3 AUROC: 0,893; sens. 74,5% esp. 81,8%.

- <3 vs. > 4 AUROC: 0,962; sens. 93,3% esp. 87,5%.

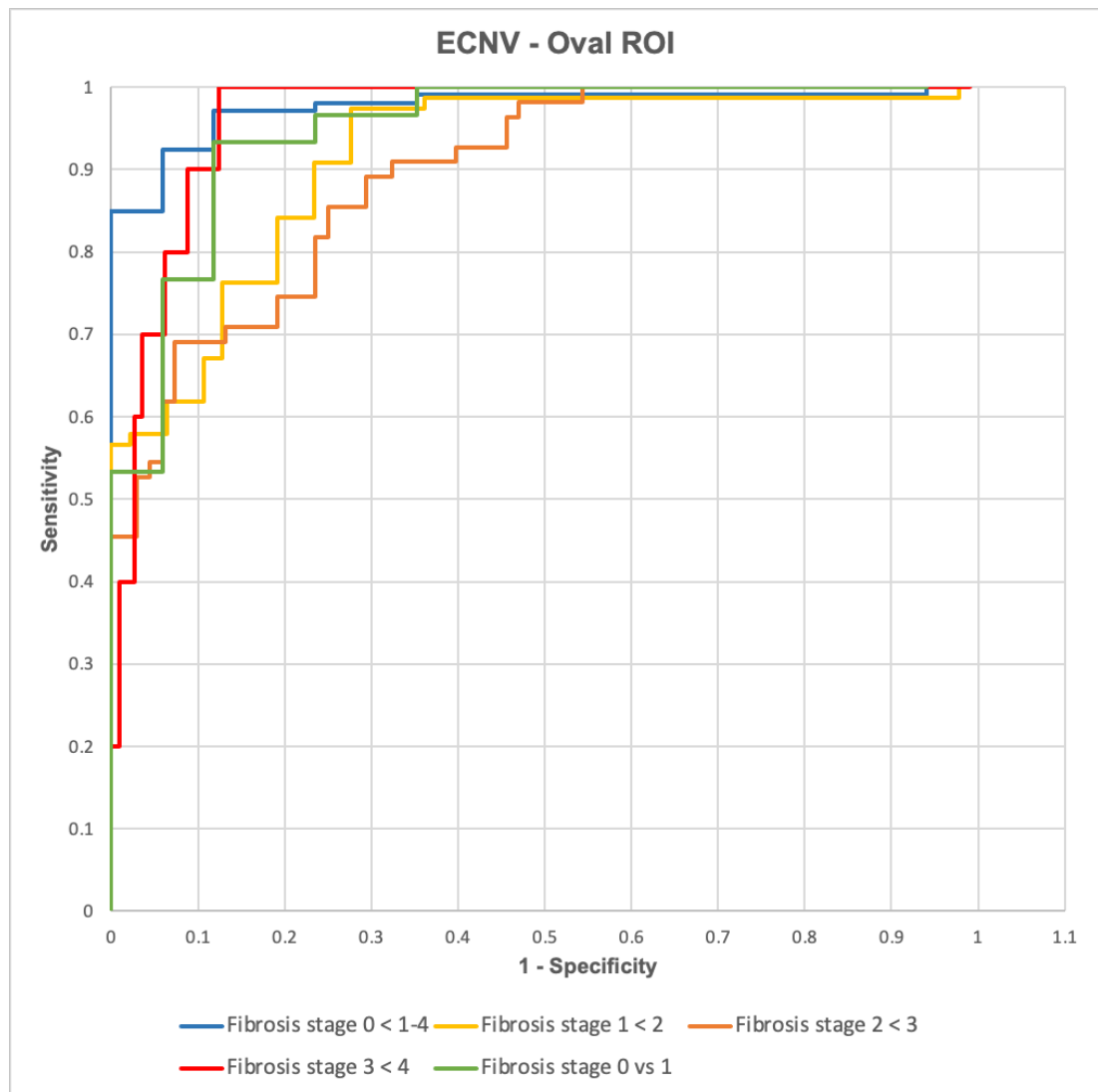
Estes dados estão descritos na Tabela 3 e também no Gráfico 5.

Gráfico 4 - Correlação entre o parâmetro FAECnvc (RDI circular) da RM e o estadio da fibrose na histologia



As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. "x" corresponde as médias dos valores e "o" a valores atípicos. O parâmetro possibilitou uma distinção estatisticamente significativa entre todos os estadios de fibrose, mesmo com o uso da RDI circular, com objetivo de se obter uma amostra mais próxima da área de fibrose no lobo hepático direito.

Gráfico 5 - Distinção dos estágios de fibrose em relação ao parâmetro FAECnvC, com o uso da RDI circular



Observar que além das comparações usuais, foi incluída a distinção entre os voluntários (F0) e pacientes com fibrose F1 (curva verde clara).

4.2 Balonização e Inflamação Lobular

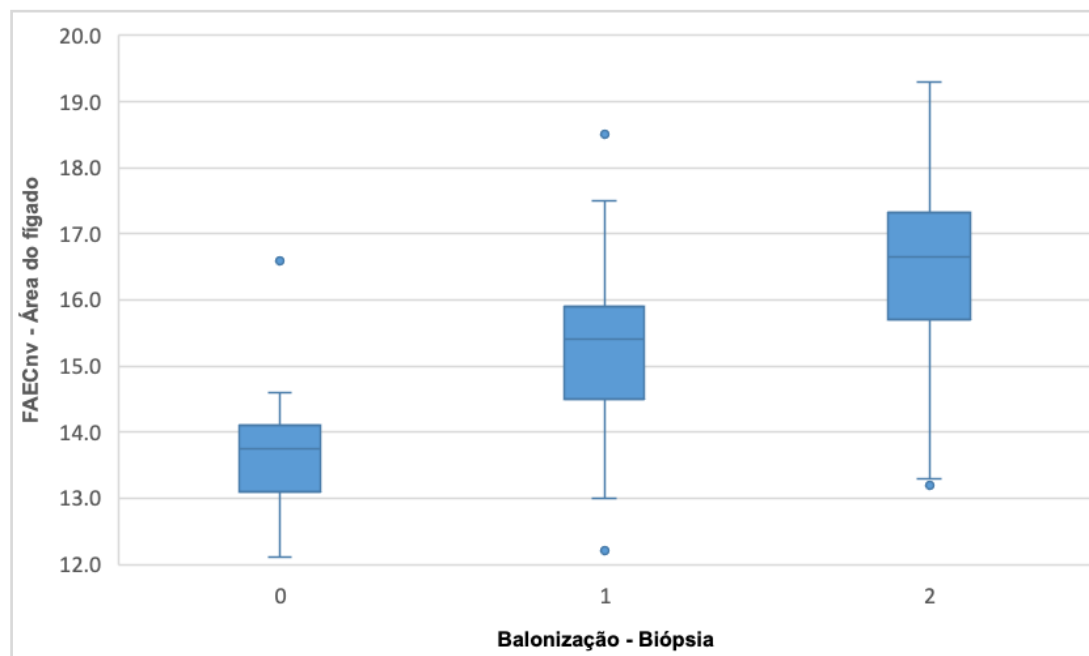
As variáveis Balonização e Inflamação lobular mostraram uma correlação significativa com a FAECnv, usando a área total do fígado, demonstrando coeficientes r_s de 0,65 e 0,52, respectivamente ($p < 0,001$), conforme demonstrado na tabela 4. As variâncias de FAECnv são homogêneas entre os grupos diferentes de balonização, com médias heterogêneas entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que as comparações exibem diferenças significativas entre todas as médias de FAECnv, sem sobreposição entre os intervalos de confiança, identificados na Tabela 4 e no Gráfico 6. Em relação à inflamação lobular as variâncias de FAECnv também são homogêneas entre os grupos, com médias heterogêneas entre os mesmos ($p < 0,001$), com as comparações demonstrando diferenças significativas entre todas as médias da variável, com exceção dos estágios 2 e 3. Existe discreta sobreposição dos intervalos de confiança entre os estágios 1 e 2, que não é identificada se quando os estágios 2 e 3 são agrupados e comparados com o estágio 1, podendo ser identificado na Tabela 4 e na Gráfico 7. Em um ponto de corte de FAECnv proporcional àquele para fibrose (dentro de 0,1%), as especificidades e sensibilidades para detectar os estágios iniciais de balão e inflamação lobular foram próximas de 1% daquela encontrada para a detecção da fase inicial da fibrose (Tabela 5).

Tabela 4 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação a balonização e inflamação lobular, utilizando a área total do fígado

RM versus histologia		Estatística geral		Intervalo de confiança 95%		ANOVA	CC
Parâmetro da RMC	Histologia	Média	DP	Limite inferior	Limite superior	P valor	r _s
FAECnv (%): Área do Fígado	Balonização					< 0,001	0,65
	0	13,6	1,0	13,2	14,1		
	1	15,3	1,2	15,0	15,7		
	2	16,5	1,2	16,2	16,8		
FAECnv (%): Área do Fígado	Inf. Lobular:					< 0,001	0,52
	0	13,5	0,7	13,1	13,9		
	1	15,4	1,4	15,0	15,9		
	2	16,1	1,3	15,8	16,5		
	3	16,7	0,8	16,0	17,4		
	2+3	16,2	1,3	15,9	16,5		

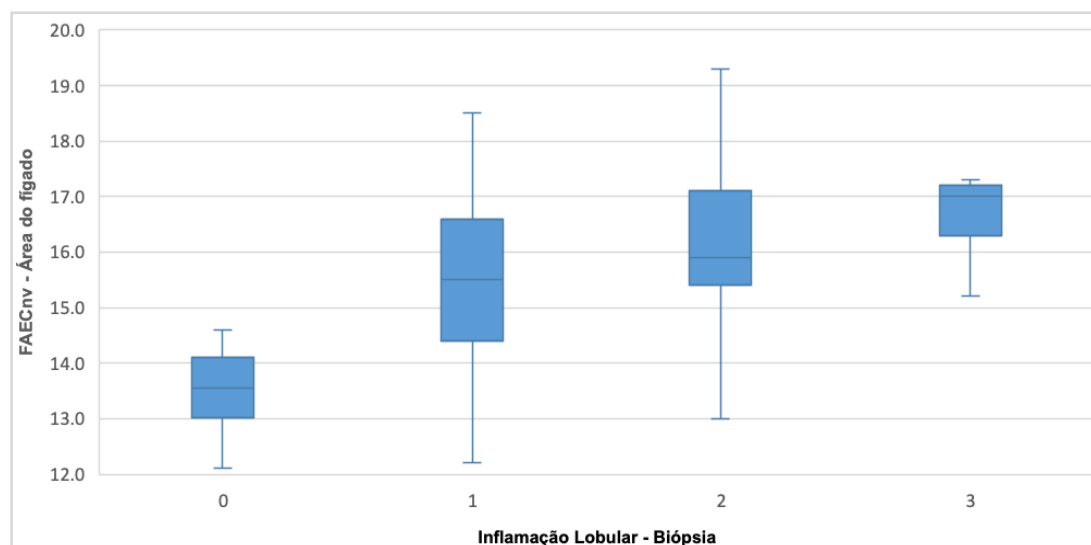
Observar que os intervalos de confiança de 95% para os resultados não demonstram sobreposição de valores para a balonização e discreta sobreposição na distinção entre os graus 1 vs. 2 e 2 vs. 3 de inflamação lobular.

Gráfico 6 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM e a balonização na histologia



As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. "x" corresponde as médias dos valores e "o" a valores atípicos. O gráfico mostra uma boa correlação entre os graus de balonização e o parâmetro FAECnv.

Gráfico 7 - Correlação entre o parâmetro FAECnv da RM e a inflamação lobular na histologia



As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. “x” corresponde as médias dos valores e “o” a valores atípicos. Observar a maior sobreposição dos valores entre os pacientes com graus 2 e 3, algo que pode ser parcialmente explicado pelo pequeno número de indivíduos neste último grupo (7).

Tabela 5 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro FAECnv de RMC em relação às classificações histológicas de balonização e inflamação lobular, usando a área total do fígado

Parâmetro da RMC	Histologia	Ponto de corte	AUROC	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
FAECnv (%): Área do Fígado	Balonização:				
	0 vs. 1-2	14,6	0,923	95,0	86,1
	0-1 vs. 2	15,6	0,833	76,1	83,3
	0 vs. 1	14,1	0,884	80,0	91,5
FAECnv (%): Área do Fígado	Inf. Lobular:				
	0 vs. 1-3	14,5	0,940	93,8	85,7
	0-1 vs. 2-3	15,6	0,749	71,2	69,3
	0-2 vs. 3	16,9	0,757	80,2	71,4
	0 vs. 1	14,1	0,900	81,2	86,0

Verificar as altas taxas de sensibilidade e especificidade encontradas na identificação de doença inicial e proximidade do valor de corte encontrado quando comparado ao da fibrose.

4.3 Interferência do tempo entre a biópsia e a RM sobre as correlações:

O intervalo entre a biópsia e o exame de RM foi dividido em quartis e foi calculada a correlação entre o estágio de fibrose e a variável FAECnv em cada um deles. Foi identificada correlação entre a fibrose a variável FAECnv em todos os intervalos de tempo, com coeficientes r_s variando entre 0,60 a 0,78 e $p < 0,001$ (Tabela 6).

Apesar de haver diferenças nos graus de correlação, não há um teste de hipótese para comparar a força de duas correlações sob uma ótica estatística, não se podendo dizer que são estatisticamente diferentes.

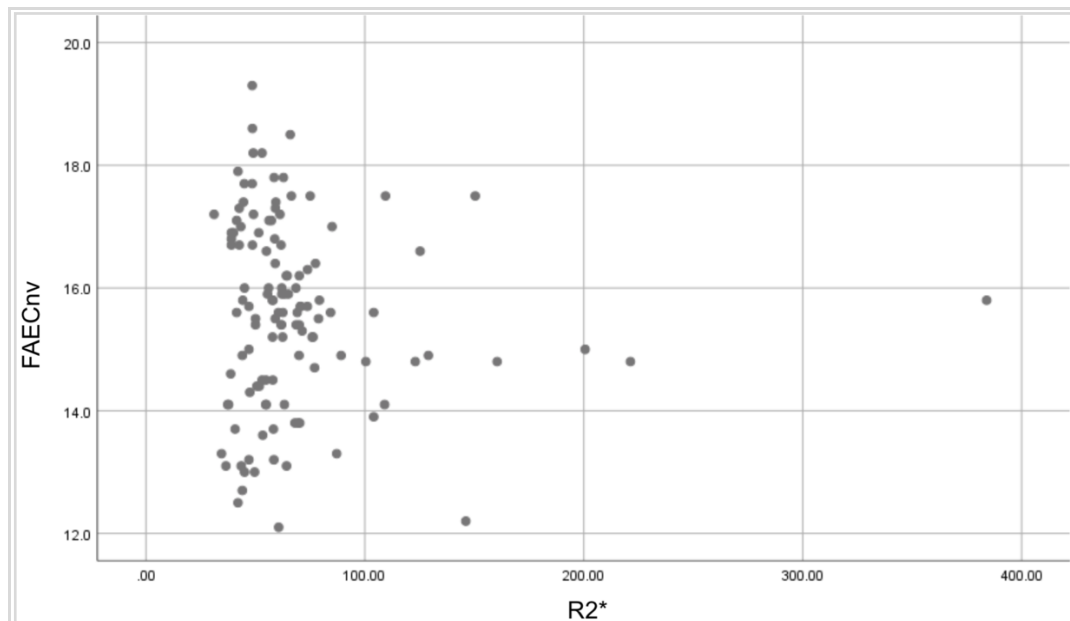
Tabela 6 - Dados de correlação relacionados a intervalos distintos entre a biópsia e o exame de RM

Tempo biópsia/RM (dias)	n	Correlação r_s	P valor
0-58	28	0,60	< 0,001
58-93	29	0,74	< 0,001
93-133	23	0,75	< 0,001
> 133	26	0,78	< 0,001

4.4 Interferência dos valores de R2* sobre os resultados

Não foi identificada qualquer categoria de correlação dos valores de R2* apresentados pelos pacientes (obtidos pelo pós-processamento da sequência MESE) com os valores de FAECnv, como pode ser identificado no Gráfico 8.

Gráfico 8 - Falta de padrão de distribuição entre R2* e o parâmetro FAECnv



4.5 Correlação entre esteatose e a fração de gordura obtida pela RM

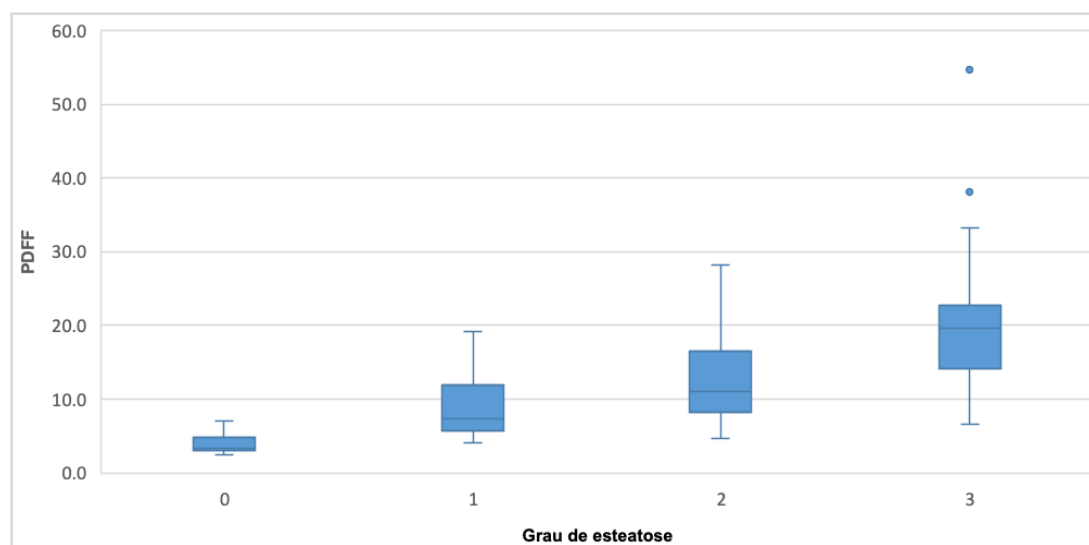
O grau de esteatose demonstrou correlação significativa com a densidade protônica da fração de gordura na RM (PDFF), $r_s = 0,72$ ($p < 0,001$) (Gráfico 9) sendo normalmente distribuída entre os graus de esteatose (Tabela 7). A análise de curva ROC para identificar indivíduos sem esteatose com um ponto de corte na PDFF de 5% demonstrou uma AUROC de 0,98 com uma esp. de 88% e sens. de 98% (Gráfico 7). Na distinção entre apenas esteatose leve (5-33%) e nenhuma esteatose, a AUROC foi de 0,94, com uma esp. de 88% e sens. de 94% usando o mesmo ponto de corte da PDFF de 5% (Tabela 8, Gráfico 10). Houve uma ligeira correlação da PDFF com o estadió de fibrose, $r_s = 0,27$, ($p < 0,003$), mas uma correlação mais acentuada com balonização, $r_s = 0,41$, ($p < 0,001$) e inflamação lobular, $r_s = 0,47$, ($p < 0,001$). Esperadamente, não houve correlação de PDFF com a

fração de água extracelular, $r_s = 0,12$, ($p > 0,185$).

Tabela 7 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação ao PDFF, utilizando a área total do fígado

RM versus histologia		Estatística geral		Intervalo de confiança 95%		ANOVA	CC
Parâmetro da RMC	Histologia	Média	DP	Limite inferior	Limite superior	P valor	r_s
PDFF (%):	Esteatose:					< 0,001	0,72
Área	do < 5%	4,0	1,2	3,3	4,6		
Fígado	5% - 33%	9,1	4,3	7,0	11,3		
	33% - 66%	13,0	5,9	11,0	15,1		
	> 66%	19,6	8,4	17,1	22,1		

Gráfico 9 - Correlação entre o parâmetro PDFF da RM e o grau de esteatose na histologia



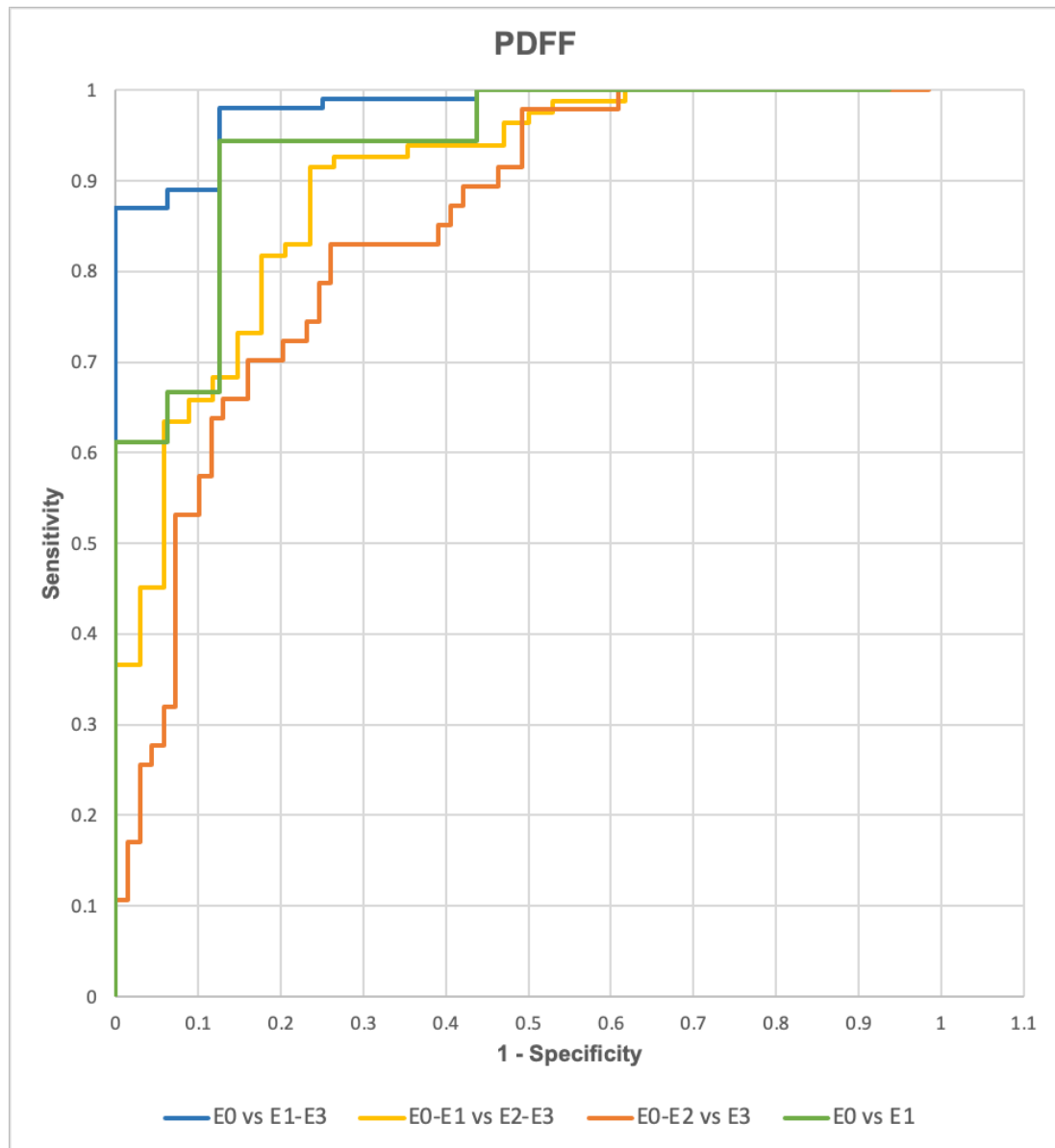
As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. “x” corresponde as médias dos valores e “o” a valores atípicos.

Tabela 8 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro PDFF de RMC em relação ao as classificações histológicas de esteatose, usando a área total do fígado

Parâmetro da RMC	Histologia	Ponto de corte	AUROC	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
PDFF (%):	Esteatose:				
Área do Fígado	< 5% vs. > 5%	5,0	0,981	87,5	98,0
	< 33% vs. > 33%	10,2	0,898	82,4	81,7

< 66% vs. > 66%	12,6	0,846	74,0	83,0
< 5% vs. 5 - 33%	5,0	0,938	87,5	94,4

Gráfico 10 - Curvas ROC para distinção dos graus de esteatose em relação ao valor de PDFF



Observar que além das comparações usuais, foi incluída a distinção entre indivíduos sem esteatose (E0) e pacientes com grau leve de esteatos (E1) (curva verde clara).

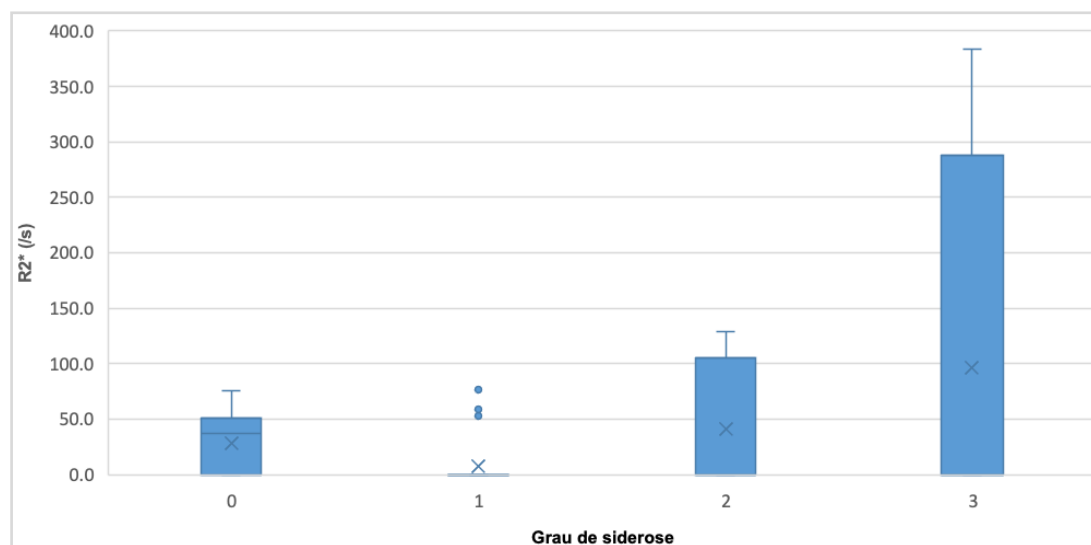
4.6 Correlação entre depósito de ferro e valor de R2* obtido pela RM

A deposição de ferro nos hepatócitos e nas células Kupfer foi significativamente correlacionada com o valor de R2* na ressonância magnética, $r_s = 0,52$, ($p < 0,001$) (Tabela 9 e Gráfico 11). Para distinguir indivíduos com depósito leve de ferro (graus 0-1 de 2-3), a AUROC foi de 0,83, onde um limiar de $69,9 \text{ s}^{-1}$ forneceu uma esp. de 83% e uma sens. de 76%. Na distinção de depósito acentuado de ferro (graus de 0-2 de grau 3), o AUROC foi de 0,97, onde um limiar de R2* de $89,1 \text{ s}^{-1}$ forneceu uma esp. de 100% e uma sens. de 91% (Tabela 10 e Gráfico 12), onde $R2^* = 89,1 \text{ s}^{-1}$ é equivalente a uma concentração de ferro hepático aproximada de $1,31 \text{ mg/g}^{63-65}$.

Tabela 9 - Estatísticas gerais e intervalos de confiança dos valores dos parâmetros de RMC em relação ao R2*, como um substituto para siderose, utilizando a área total do fígado

RM versus histologia		Estatística geral		Intervalo de confiança 95%		ANOVA	CC
Parâmetro da RMC	Histologia	Média	DP	Limite inferior	Limite superior	P valor	r_s
R2* (/s):	Siderose:					< 0,001	0,52
Área do fígado	0	54,5	16,3	50,5	58,5		
	1	69,0	29,2	59,0	79,0		
	2	90,6	42,4	68,8	112,4		
	3	197,7	123,8	100,4	394,7		

Gráfico 11 - Correlação entre o parâmetro R2* da RM e o grau de siderose na histologia

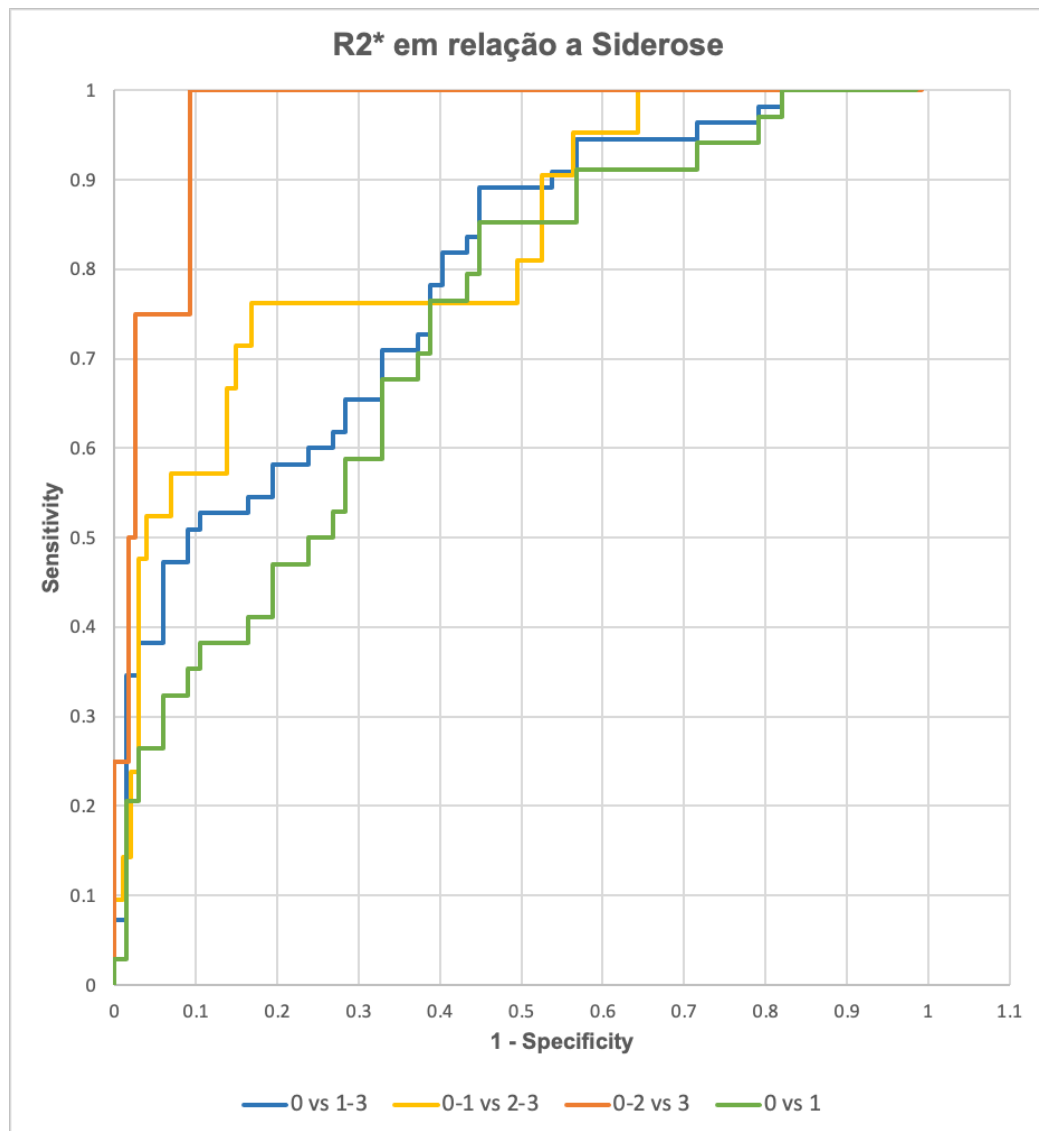


As barras mostram as medianas, o primeiro e o terceiro quartil, com as extremidades definidas pelas barras. “x” corresponde as médias dos valores e “o” a valores atípicos. Observar a variabilidade presente nos diferentes estádios de sobrecarga férrica, com maior diferenciação entre os pacientes com grau 3.

Tabela 10 - Análise da curva ROC com os valores de corte definidos para o parâmetro R2* de RMC em relação ao as classificações histológicas de siderose, usando a área total do fígado

Parâmetro da RMC	Histologia	Ponto de corte	AUROC	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
R2* (1/s): Área do Fígado	Siderose: 0 vs. 1-3	53,0	0,789	55,2	89,1
	0-1 vs. 2-3	69,9	0,826	83,2	76,2
	0-2 vs. 3	89,1	0,966	100,0	90,7

Gráfico 12 - Curvas ROC para distinção dos graus de siderose em relação ao valor de R2*



4.7 Análise interobservador

4.7.1 Avaliação RM

A análise de um subgrupo de 32 pacientes (26% da amostra total) mostrou uma correlação significativa entre os leitores para todos os principais parâmetros de RM descritos, com correlação intraclassa (CIC) de 0,973 para FAECnv, 0,979 para R2* e 0,994 para esteatose (Tabela 11), o que pode ser observado pelos gráficos de Bland-Altman para cada variável nos Gráficos 13, 14 e 15.

Tabela 11 - Coeficientes de correlação e IC95% entre os parâmetros de RM entre dois leitores diferentes, realizada num subgrupo de 32 pacientes

Parâmetro	CIC	p valor	IC 95% inferior	IC 95% superior
FAECnv (%)	0,973	<0,001	0,944	0,987
Esteatose (%)	0,994	<0,001	0,988	0,997
R2* (s ⁻¹)	0,979	<0,001	0,957	0,990

Gráfico 13 - Bland-Altman para fibrose, mostrando média de diferenças de -0,25, com desvio padrão inferior de -1,14 e superior de 0,91

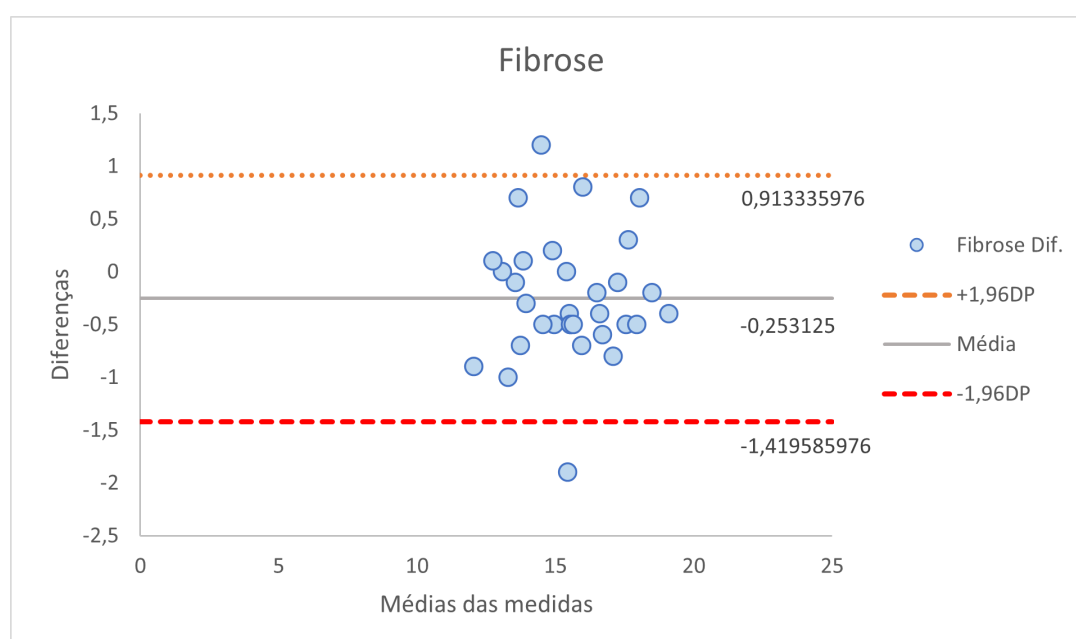


Gráfico 14 - Bland-Altman para esteatose, mostrando média de diferença de 0,6, com desvio padrão inferior de -2,21 e superior de 3,41

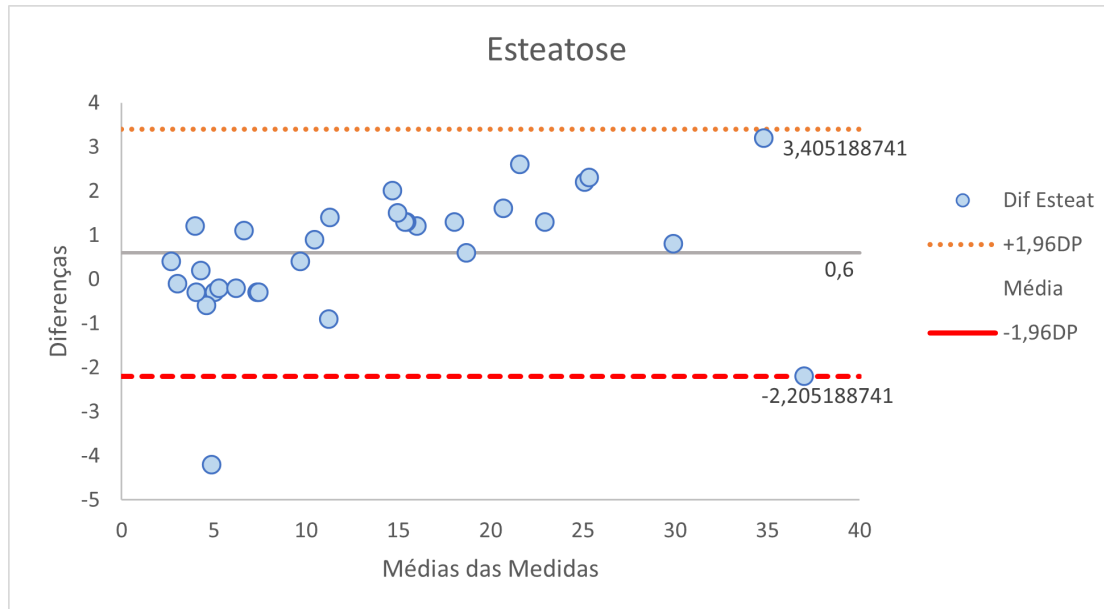
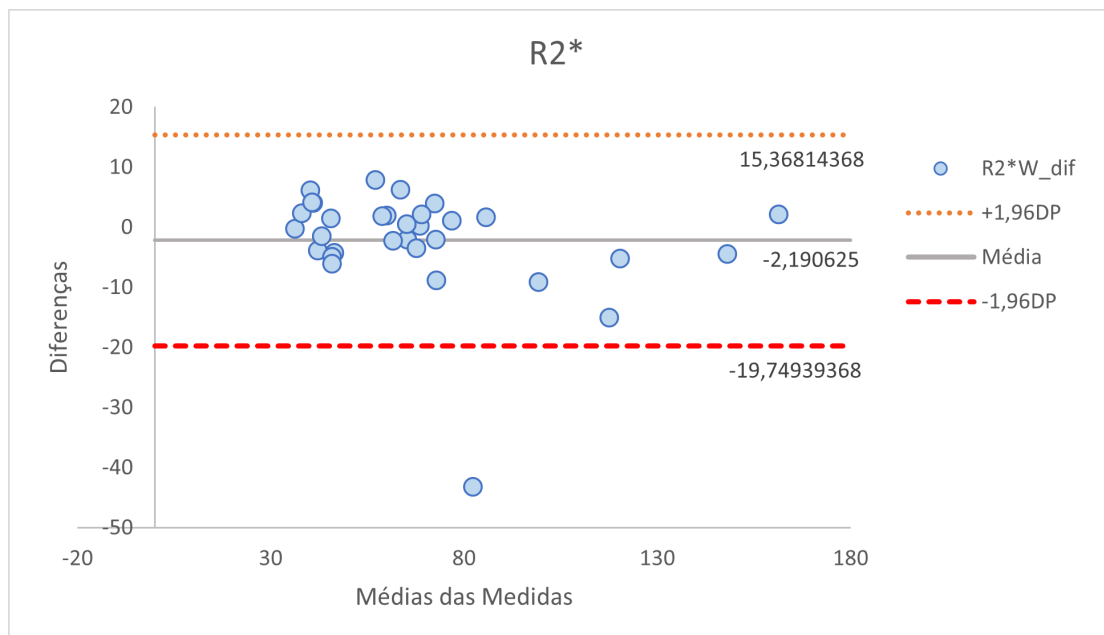


Gráfico 15 - Bland-Altman para R2*, mostrando média de diferença de -2,19, com desvio padrão inferior de -19,75 e superior de 15,37



4.7.2 Avaliação histológica

A análise de um subgrupo de 67 pacientes identificou uma boa correlação entre as análises inicial (prospectiva) e a revisão das lâminas de biópsia hepática, com coeficientes variando entre 0,704 para depósito de ferro (siderose) a 0,882 para balonização, dando maior credibilidade ao resultado obtido. Os resultados da análise de comparação estão detalhados na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficientes de correlação entre os dados de biópsia da primeira leitura (prospectiva) e a revisão de biópsia, realizada num subgrupo de 67 pacientes

		1ª avaliação			
		Esteatose	Balonização	Inflamação	Siderose
2ª avaliação	Esteatose	Coef. Corr.	0,770		
		Sig. (p)	0,000		
		n	67		
	Balonização	Coef. Corr.		0,882	
		Sig. (p)		0,000	
		n		67	
	Inflamação	Coef. Corr.			0,787
		Sig. (p)			0,000
		n			67
	Siderose	Coef. Corr.			0,704
		Sig. (p)			0,000
		n			67

5 DISCUSSÃO

O estudo avaliou uma nova técnica para estimar fibrose em pacientes portadores de EHNA, por RMC baseada em T2, focada na estimativa da expansão do volume do componente extracelular não vascular do fígado. Os resultados obtidos mostraram uma correlação significativa com a fibrose, determinando uma alta acurácia na distinção de cada estadio individual (AUROC > 0,91), principalmente na doença inicial (AUROC = 0,95).

Esta característica contrasta com a avaliação de fibrose pela elastografia, visto que seu desempenho é maior nos estadios mais avançados de fibrose, com menor acurácia na doença inicial. Em uma metanálise recente, Singh *et al.*¹¹ destacaram esta particularidade com acurácias crescentes à medida que o estadio de fibrose progride, indo de uma AUROC de 0,84 nos estadios iniciais até 0,92 em pacientes com cirrose, abordando todas as etiologias de hepatopatia. Quando a análise foi restrita para pacientes com DHGNA, pode-se observar o mesmo efeito, com AUROC de 0,89 para F1 até 0,9-0,94 para F3-F4. Esse aspecto é observado praticamente em todas as técnicas que utilizam elastografia como método de estimativa da fibrose, seja por ultrassonografia ou RM, com valores menores de acurácia nas fases iniciais da fibrose, conforme demonstrado em trabalhos usando as técnicas de elastografia transitória, imagem de impulso de força de radiação acústica (*acoustic radiation force impulse imaging* - IIFRA), imagem

de cisalhamento supersônico (*supersonic shear imaging* - ICS) e mesmo imagem elasticidade da onda de cisalhamento (*shear-wave elasticity imaging* - IEOC)^{9,10}. A performance da RM é geralmente avaliada como superior aos demais métodos de elastografia, conforme estimado num estudo de revisão sistemática recente de Hsu *et al.*⁶⁶, explorando pacientes de DHGNA com RM e ET. Esse trabalho demonstrou estas características, com AUROC's de 0,87 para RM e 0,82 para ET para distinguir indivíduos normais de qualquer fibrose, evoluindo para 0,94 e 0,84, respectivamente, na diferenciação entre cirróticos e outros pacientes. Estes dados levaram a alguns autores afirmar que a elastografia não deveria ser usada na distinção entre fibrose e inflamação inicial, ou mesmo na diferenciação entre esteatose simples e EHNA⁶⁷. O menor desempenho da elastografia nos estádios iniciais pode estar relacionada a baixa concentração de colágeno no parênquima nesta fase, o que pode ser responsável pela discreta elevação da rigidez no fígado, mesmo que outros fatores possam ter alguma repercussão sobre esse parâmetro^{68,69}, destacando-se que esses dados são secundários a estudos com modelos de doença hepática em animais, usando o tetracloreto de carbono (CCl₄). Para tentar superar a limitação da elastografia em estágios iniciais da doença, alguns trabalhos têm explorado outros parâmetros dos tecidos, por técnicas 3D e multifrequência, usando medições da taxa de amortecimento e a "rigidez" em modelos animais, com alguns resultados interessantes, conforme descrito em 2017 por Yin *et al.*⁷⁰. Apesar do sucesso inicial, outros autores não conseguiram reproduzir os mesmos achados em pacientes humanos⁷¹. Além disto, deve-se ressaltar que o uso deste método

necessita de equipamento específico de hardware e software para sua utilização, elevando seu custo e tornando sua abrangência menor.

A abordagem de se estimar o valor da fração extracelular de água em um determinado órgão tem demonstrado melhor acurácia na avaliação de inflamação e fibrose iniciais na EHNA e em hepatopatias de outras etiologias. O espaço extracelular do fígado (EEF) geralmente compreende menos de 3% da área de tecido analisado⁷², constituído predominantemente pelo componente vascular, como sinusoides, veias hepáticas e a tríade portal, junto com as macromoléculas, sendo a principal via de comunicação e nutrição do parênquima. Durante o desenvolvimento da fibrose, apesar da composição molecular não se alterar significativamente, existe uma expansão deste compartimento de três a cinco vezes⁷³, particularmente por acúmulo excessivo dos subtipos de colágeno. Um dos compartimentos inicialmente implicado nessas mudanças é justamente o espaço perisinusoidal (ou espaço de Disse), que contém usualmente uma matriz de membrana basal de baixa densidade e porosa, importante para a função das células parenquimatosas e permitindo a troca entre a corrente sanguínea e os hepatócitos. Durante a fibrose existe uma modificação deste espaço, tanto na quantidade das macromoléculas, quanto na qualidade das mesmas (os subtipos de colágeno se modificam), alterando suas funções^{51,52}. Alguns autores conseguiram inclusive identificar mudanças globais no conteúdo corporal total de água intra e extracelular nestes pacientes, indicando uma tendência mais geral⁷⁴. Dentre os métodos de imagem não invasivos usados para a caracterização da expansão do EEF, existem estudos com uso de contraste, direcionados para avaliação da fase tardia do exame,

seja por TC ou RM e outros usando relaxometria T1 ou T2 na RM. Um dos primeiros estudos utilizando contraste nesta análise foi o de Semelka *et al.*⁴², que fizeram uma análise subjetiva no padrão reticular de realce do parênquima e descreveu a provável relação deste achado com as mudanças no EEF, mostrando resultados positivos com um número limitado de pacientes. Este trabalho cita o estudo de Martí-Bonmatí *et al.*⁷⁵ de 1993 como base para seus resultados, onde a técnica STIR foi usada quantitativamente em um número maior de pacientes, com resultados positivos. Entre os artigos que avaliaram o EEF usando especificamente o contraste, destaca-se o de Varenika *et al.*⁴⁴, em 2013, usando um modelo de fibrose em ratos e TC. Esse trabalho mostrou a expansão do compartimento extracelular durante o desenvolvimento/progressão da fibrose nos modelos experimentais de ratos, de 0,46% da área de fígado amostrado até 3,5%. Além disto, foi caracterizada uma correlação negativa do material de contraste com o estadio de fibrose histologicamente determinado, com um r_s de 0,86. Existem outros trabalhos com pacientes usando técnicas similares de TC, como o de Bandula *et al.*⁴³, em 2015, correlacionando o EEF com fibrose hepática e a área proporcional de colágeno (APC) em um grupo de 33 pacientes prospectivamente. Os autores demonstraram uma correlação positiva entre EEF, APC e FH, com valores de r_s de 0,64 e 0,38, respectivamente, sendo também realizado um modelo de regressão que mostrou boa predição de APC usando EEF e FH, com r_s de 0,67. Deve-se destacar que a diferenciação teve melhor desempenho em graus de fibrose mais elevados, com correlação e predição piores nos graus iniciais. Outra abordagem focada no mesmo objetivo foi realizada em alguns trabalhos

usando contrastes hepatoespecíficos em RM, como o de Wang *et al.*⁷⁶ que avaliou o gadobenato de dimeglumina e comparou os mapas T1 após 15 minutos de injeção com dois métodos laboratoriais (*aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index* - APRI e *fibrosis index based on the four factor* - FIB4) e o estadio de fibrose em 91 pacientes. Os autores demonstraram correlação significativa entre o EEF (calculado pelo mapa T1 do fígado e aorta) e o estadio de fibrose, com r_s de 0,727. O método foi superior à correlação obtida com os métodos laboratoriais (APRI com r_s de 0,466/FIB4 com r_s de 0,440), sendo ainda o único independente na análise multivariada. Houve ainda a possibilidade de distinção do método com quase todos os estadios de fibrose (com exceção de F1 com F2, F1 com F3 e F1 com F4). Os autores ainda exploraram a atividade inflamatória com o EEF, demonstrando uma correlação mais fraca ($r_s = 0,503$), porém apenas a fibrose foi um fator independente.

O uso de técnicas usando relaxometria T1 e T2 também já foi explorado em outros trabalhos, sendo a primeira mais frequentemente estudada. A relaxometria simples T2 mostrou uma correlação quantitativa com o estadio de fibrose no trabalho de Guimaraes *et al.*⁴⁷, onde foram estudados 123 pacientes com graus variados de fibrose (porém sem esteatose ou depósito de ferro). Os autores conseguiram diferenciar entre graus leve, moderado e grave de fibrose com valores obtidos de T2, baseados na regressão monoexponencial simples, usando os dois tempos de eco habitualmente adquiridos em exames abdominais. Os trabalhos focados em relaxometria T1 tiveram maior repercussão, destacando-se aqueles com correção de sobrecarga férrica (correção de R2*, denominada

cT1 ou *corrected T1*). Os resultados iniciais desta técnica foram descritos em um artigo de 2014⁴⁶ usando 79 pacientes com etiologias variadas de hepatopatia crônica (a maioria com hepatite viral ou EHNA) e sete voluntários sem doença hepática conhecida, sendo que o conceito era explorar a expansão do EEF usando o mapa cT1. Os autores ainda usaram espectroscopia no lobo hepático direito para avaliar esteatose. O resultado obtido foi favorável, com distinção significativa entre quase todos os graus de fibrose (exceto entre os grupos F1-F2 vs. F3-4), com boa acurácia na identificação entre indivíduos normais daqueles com qualquer estadio de fibrose (AUROC de 0,94) e coeficiente de correlação (r_s) geral de 0,68. Foi realizada análise subgrupo dos pacientes com hepatite viral ($n = 31$), obtendo-se correlação $r_s = 0,76$ e daqueles com EHNA ($n = 31$), com correlação $r_s = 0,62$ e bom desempenho da distinção entre indivíduos normais e qualquer fibrose neste último subgrupo (AUROC de 0,90). Estes mesmos autores avaliaram posteriormente um grupo de 71 pacientes com EHNA em 2017⁷⁷ usando a mesma técnica, porém com um escore de inflamação e fibrose desenvolvido no primeiro trabalho, denominado *liver inflammation and fibrosis* (LIF), que usava os valores de corte em cada grupo, variando de 0 a 4. Os resultados foram favoráveis, com coeficiente de correlação r_s de 0,51 para todos os graus de fibrose, observando-se ainda correlação significativa com balonização (r_s de 0,59) e com atividade inflamatória (balonização + inflamação lobular com r_s de 0,58). A acurácia para o diagnóstico de EHNA e sua diferenciação com esteatose simples foi de 0,80, sendo que na distinção entre doença leve em relação a significativa

a acurácia foi de 0,89.

Os resultados do presente trabalho mostraram um desempenho geralmente superior aos demais trabalhos descritos, particularmente na avaliação de doença inicial, aspecto este que pode estar relacionado a alguns fatores. O primeiro é o uso de uma técnica mais avançada de relaxometria, baseada em múltiplos compartimentos, que possibilita a melhor avaliação do espaço extracelular, quantificando diretamente sua expansão ao invés do uso de medidas indiretas via mensuração de T1/T2. Além disso, o método possibilita a separação da fração de água extracelular entre componentes vascular (sinusoidal) e não vascular (perisinusoidal), denominados FAECv e FAECnv, respectivamente, sendo que as evidências associando esses componentes de sinal extracelular com compartimentos estruturais reais são múltiplas: o sinal dos vasos na RM é evidente nos mapas de fração de água extracelular e só fica retido nos mapas de FAECv; FAECv não está correlacionada com fibrose e é independente da FAECnv; o valor médio da FAECv, ajustado para densidade de prótons no sangue foi estimado em ~66%⁷⁸, fornecendo uma fração de volume de ~24%, proporcional ao volume de sangue do fígado⁷⁹. O isolamento do componente de sinal sinusoidal da água extracelular fornece assim mapas do espaço perisinusoidal e, conseqüentemente, todo o mapa de FAECnv pode ser usado na área do fígado selecionada para identificar diferenças regionais na fibrose, ao contrário dos mapas cT1, onde uma pequena RDI deve ser colocada distante de vasos sanguíneos evidentes. Outro ponto a ser considerado é a correção da influência da esteatose sobre a análise, algo não realizado pela técnica

cT1 e T2 monoexponencial, o que poderia afetar as medidas.

Apesar dos benefícios, deve-se ressaltar que utilização das técnicas de RMC não são isentas de riscos, principalmente pelos graus de liberdade matemática, porém a metodologia usada para sua estimativa diferiu de métodos convencionais, conforme descrito acima, com performance mais robusta no teste usando o modelo sintético. Outra forma de verificar o desempenho do método pode ser observada na alta correlação interobservador obtida na análise de subgrupos, algo que tem demonstrado reprodutibilidade menor quando se avaliam técnicas semelhantes, como a difusão por movimento incoerente intravoxel (*intravoxel incoherent motion* - MIV), descrita inicialmente por Le Bihan *et al.*^{80,81}. Esta análise detalhada de difusão também tem como objetivo a separação de compartimentos distintos (difusão tecidual e perfusão), porém demonstra alta variabilidade entre as leituras, refletindo as dificuldades com esta abordagem, como mostrado em um artigo recente de 2015⁸², onde se observaram coeficientes de variação de até $35,9 \pm 15,18\%$ para a fração de perfusão (f) e de até $138,6 \pm 140,05\%$ para o coeficiente de difusão relacionada à perfusão (D^*).

O presente estudo tem várias limitações, destacando-se predominantemente a utilização apenas de pacientes com EHNA, não sendo possível extrapolar o método para outras etiologias. Pode-se ainda questionar o uso de voluntários sem esteatose no trabalho, como um grupo nitidamente diferente dos pacientes do estudo. Esta decisão foi tomada por dois motivos, o primeiro relacionado a origem dos pacientes em um centro de referência terciário, sem que nenhum paciente biopsiado apresentasse esteatose

simples, o que impossibilitaria a avaliação de pacientes sem inflamação ou fibrose. O segundo fato está relacionado à utilização de uma técnica nova, sem trabalhos anteriores para demonstrar sua atuação em indivíduos normais, sem doença hepática crônica. Deve-se ressaltar que o uso dos voluntários foi consistente com o trabalho anterior usando cT1, onde não foi identificada diferença significativa na avaliação de inflamação e fibrose entre este grupo e pacientes com esteatose simples⁴⁶. O uso de apenas um patologista na revisão das lâminas de biópsia foi outra limitação do estudo, relacionada às particularidades do trabalho da equipe da patologia do hospital, inviabilizando uma avaliação paralela. No entanto, a análise de um subgrupo da amostra, comparando a revisão com os dados prospectivos do relatório inicial mostrou uma correlação acima do encontrado na literatura, resolvendo parcialmente a limitação e corroborando as análises histológicas. O mesmo pode ser dito da limitação relacionada a leitura dos exames de RM ser feita apenas por um radiologista, algo intrínseco ao desenvolvimento de uma nova metodologia e pelas particularidades do departamento, sendo também parcialmente corrigida pela análise de subgrupo. Ressalta-se ainda que em alguns subgrupos de histologia haviam menos de 10 pacientes para análise de curva ROC. O intervalo de tempo entre a biópsia e a ressonância magnética se estendeu em até 6 meses em alguns casos, porém nenhuma diferença foi encontrada na correlação da FAECnv com o estadio de fibrose relacionado a esse intervalo. Outras limitações que merecem ser descritas são o uso de um único aparelho RM, a avaliação de apenas um corte transversal do fígado e o fato que algumas análises da curva ROC foram

feitas com menos de 10 pacientes em alguns subgrupos histológicos.

6 CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. Foi encontrada uma correlação significativa entre o parâmetro de RM FAECnv e todos os estadios da fibrose hepática na histologia, mais evidente nos graus iniciais, sem sobreposição nos intervalos de confiança de 95% entre cada estágio.
 - a. O tempo entre a biópsia e a RM não afetou os resultados obtidos.
 - b. Não foi observada interferência dos valores de $R2^*$ do fígado com os resultados da correlação supracitada.
2. Foi encontrada correlação significativa entre o grau de balonização e inflamação lobular com o parâmetro FAECnv da RM, mais robusto com a primeira, onde não foi identificada sobreposição nos intervalos de confiança de 95% entre cada estágio.
3. Foi encontrada correlação significativa entre a porcentagem de fração de gordura estimada na RM com o grau de esteatose avaliado na histologia. Da mesma forma, o valor de $R2^*$ mostrou correlação significativa com a sobrecarga férrica estimada na histologia, particularmente nos graus mais elevados.
4. As análises interobservador feitas nos subgrupos de pacientes mostraram alto grau de concordância nos parâmetros estimados pela RM e na avaliação histológica.

Em resumo, o estudo apresenta um método não invasivo de RM para avaliação de fibrose e inflamação em pacientes com EHNA baseado na relaxometria multicomponente T2, fornecendo discriminação precisa de todos os estágios da fibrose, mesmo na doença inicial. A correlação da esteatose e deposição de ferro com os parâmetros T2* de RMC também foi diagnóstica. Em combinação, a RMC T2/T2* oferece uma nova abordagem para avaliar fígados de pacientes com risco de DHGNA/EHNA: é prontamente implementada sem a necessidade de “hardware” adicional, evita o uso de agentes de contraste e radiação e pode ser realizada em um curto tempo de varredura de menos de 10 minutos.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0336/11

Título: AVALIAÇÃO POR IMAGEM DA DOENÇA DIFUSA HEPÁTICA

Pesquisador Responsável: Manoel de Souza Rocha

Pesquisador Executante: Hilton Leão Filho

Disciplina: Radiologia

Departamento: RADIOLOGIA E ONCOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 15/12/2016, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- **Carta com data de entrada de 23/11/2016 - Emenda ao protocolo de estudo solicitando alteração no título para "Avaliação por imagem da doença difusa hepática".**
- **Carta com data de entrada de 23/11/2016 - Relatório Parcial.**

CAPPesq, 15 de Dezembro de 2016

Prof. Dr. Joel Faintuch
Vice - Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq



Departamento de Radiologia e Oncologia

Av. Dr. Arnaldo, 455, 4º andar – sala 4123
CEP 01246-903
São Paulo - SP - Brasil
Fone/Fax: (11) 3061.7161

DRO - APROVAÇÃO 08/2014

APROVAÇÃO

O Departamento de Radiologia e Oncologia aprovou em 12/02/14, o projeto de pesquisa:
"Avaliação por imagem da esteatose hepática".

Pesquisador Responsável: Dr. Manoel De Souza Rocha

Pesquisador Executante: Dr. Hilton Muniz Leão Filho

São Paulo, 12 de fevereiro de 2014.


Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Chefe do Departamento de Radiologia e Oncologia
FMUSP

Anexo B - Termo de Consentimento de Livre Esclarecimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Ressonância magnética multiparamétrica do fígado em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica.**
 PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. MANOEL DE SOUZA ROCHA
 CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR ASSOCIADO
 CONSELHO REGIONAL Nº 41671
 UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 MESES

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**1 – Natureza e objetivo do estudo:**

Este é um convite para sua participação em um estudo sobre ressonância magnética multiparamétrica do fígado em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica. A sua participação é voluntária e nós gostaríamos de solicitar sua permissão para utilizar as informações do seu prontuário e para realização de exame de ressonância magnética, sendo necessário uma punção de veia do antebraço.

O depósito de gordura no fígado é uma condição frequente na população em geral e vem sendo amplamente estudado atualmente, uma vez que está relacionada a aumento de risco de várias condições clínicas, inclusive cardiovasculares. Uma possibilidade de complicação é o desenvolvimento de um processo inflamatório no fígado, denominado esteato-hepatite não alcoólica, que é diagnosticada atualmente por biópsia do fígado.

Nosso objetivo é avaliar as alterações hepáticas, sejam elas relacionadas a depósito de gordura (esteatose), de ferro ou mesmo a alterações inflamatórias e de fibrose, de forma não invasiva pela imagem e comparar com os resultados obtidos pela biópsia prévia.

2 – Como é que acontece a sua participação nesse estudo?

A sua participação nesse estudo é voluntária. Caso você permita serão utilizadas informações contidas no seu prontuário médico e no seu arquivo digital de exames radiológicos. Haverá também a realização de ressonância magnética do abdome superior dedicada para avaliação do fígado. Se você não apresentar contraindicação, será administrado meio de contraste intravenoso através de punção de veia periférica no estudo de imagem.

3 - Minha participação pode representar algum risco para mim?

A sua participação ou não nesse estudo não afetará o tratamento da sua doença.

Os riscos com o exame de ressonância magnética são muito raros, estando relacionados principalmente ao uso de contraste intravenoso. Existe a possibilidade de eventos alérgicos com o uso deste contraste, com riscos de 0,01% para reações leves e de cerca de 0,008% para reações mais graves. Caso estes eventos ocorram, o departamento está preparado para o tratamento adequado.

Alguns pacientes relatam desconforto durante a realização do exame de RM, uma vez que o mesmo produz ruídos de alta magnitude (99dB). O tempo de exposição aos ruídos está abaixo do limite estipulado pela Academia Americana de Audiologia e portanto, não causam trauma acústico. Serão fornecidos protetores auriculares que reduzem o ruído em até 30%.

4 - Quais serão seus benefícios para a participação neste estudo?

Você realizará um exame de imagem geralmente necessário para a condução de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica em aparelho dedicado, com técnicas avançadas para avaliação hepática. Além disto a avaliação dos resultados mostrará o potencial da RM na avaliação do diagnóstico e acompanhamento desta condição no intuito de substituir em alguns casos técnicas invasivas como a biópsia.

5 - O que acontece caso eu decida não participar do estudo?

Você é totalmente livre para decidir e sua participação é voluntária. Seu tratamento e seguimento clínico não serão prejudicados ou modificados se você não quiser participar da pesquisa.

6 - Saída do estudo:

Conforme já dito anteriormente, sua participação é totalmente livre e você poderá retirar sua autorização para participação nesse estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para você.

7 - Confidencialidades sobre as informações relativas ao seu caso:

Todas as suas informações obtidas serão mantidas confidencialmente. Os dados serão armazenados e analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente; seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, preservando sua privacidade. Para fins de pesquisa, o (a) Sr.(a) será identificado (a) por um código e não pelo seu nome.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

8 REFERÊNCIAS

1. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
2. Woolf SH, Schoomaker H. Life Expectancy and mortality rates in the United States, 1959-2017. *JAMA*. 2019;322(20):1996-2016.
3. Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(12):2650-66.
4. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015;313(22):2263-73.
5. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):686-90.

6. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, Kawaguchi T, Arrese M, Valenti L, Shiha G, Tiribelli C, Yki-Järvinen H, Fan JG, Grønbæk H, Yilmaz Y, Cortez-Pinto H, Oliveira CP, Bedossa P, Adams LA, Zheng MH, Fouad Y, Chan WK, Mendez-Sanchez N, Ahn SH, Castera L, Bugianesi E, Ratziu V, George J. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* 2020;73(1):202-9.
7. European Association for Study of Liver; Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol.* 2015;63(1):237-64.
8. apper EB, Lok AS. Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice. *N Engl J Med.* 2017;377(8):756-68.
9. Cassinotto C, Boursier J, de Lédinghen V, Lebigot J, Lapuyade B, Cales P, Hiriart JB, Michalak S, Bail BL, Cartier V, Mouries A, Oberti F, Fouchard-Hubert I, Vergniol J, Aubé C. Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology.* 2016;63(6):1817-27.

10. Herrmann E, de Lédinghen V, Cassinotto C, Chu WC, Leung VY, Ferraioli G, Filice C, Castera L, Vilgrain V, Ronot M, Dumortier J, Guibal A, Pol S, Trebicka J, Jansen C, Strassburg C, Zheng R, Zheng J, Francque S, Vanwolleghem T, Vonghia L, Manesis EK, Zoumpoulis P, Sporea I, Thiele M, Krag A, Cohen-Bacrie C, Criton A, Gay J, Deffieux T, Friedrich-Rust M. Assessment of biopsy-proven liver fibrosis by two-dimensional shear wave elastography: An individual patient data-based meta-analysis. *Hepatology*. 2018;67(1):260-72.
11. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, Hassanein T, Asbach P, Godfrey EM, Yin M, Chen J, Keaveny AP, Bridges M, Bohte A, Murad MH, Lomas DJ, Talwalkar JA, Ehman RL. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(3):440-451.e6.
12. Rustogi R, Horowitz J, Harmath C, Wang Y, Chalian H, Ganger DR, Chen ZE, Bolster BD Jr, Shah S, Miller FH. Accuracy of MR elastography and anatomic MR imaging features in the diagnosis of severe hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Magn Reson Imaging*. 2012;35(6):1356-64.
13. Cannella R, Dasyam N, Seo SH, Furlan A, Borhani AA. Performance of morphologic criteria for the diagnosis of cirrhosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis compared to other etiologies of chronic liver disease: effect of level of training and experience. *Abdom Radiol (NY)*. 2021;46(3):960-8.

14. Raptis DA, Fischer MA, Graf R, Nanz D, Weber A, Moritz W, Tian Y, Oberkofler CE, Clavien PA. MRI: the new reference standard in quantifying hepatic steatosis? *Gut*. 2012;61(1):117-27.
15. Bannas P, Kramer H, Hernando D, Agni R, Cunningham AM, Mandal R, Motosugi U, Sharma SD, Munoz del Rio A, Fernandez L, Reeder SB. Quantitative magnetic resonance imaging of hepatic steatosis: Validation in ex vivo human livers. *Hepatology*. 2015;62(5):1444-55.
16. Sirlin CB, Reeder SB. Magnetic resonance imaging quantification of liver iron. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010;18(3):359-81.
17. European Association for the Study of the liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol*. 2010;53(1):3-22.
18. Musallam KM, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Porter JB. Cross-talk between available guidelines for the management of patients with beta-thalassemia major. *Acta Haematol*. 2013;130(2):64-73.
19. Huwart L, Sempoux C, Vicaut E, Salameh N, Annet L, Danse E, Peeters F, ter Beek LC, Rahier J, Sinkus R, Horsmans Y, Van Beers BE. Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;135(1):32-40.
20. Yin M, Glaser KJ, Talwalkar JA, Chen J, Manduca A, Ehman RL. Hepatic MR elastography: clinical performance in a series of 1377 consecutive examinations. *Radiology*. 2016;278(1):114-24.

21. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, Sebastiani G, Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Stal P, Wong VW, Kechagias S, Hultcrantz R, Loomba R. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-65.
22. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Keach JC, Lafferty HD, Stahler A, Haflidadottir S, Bendtsen F. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
23. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1342-1359.e2.
24. Loomba R, Lim JK, Patton H, El-Serag HB. AGA Clinical practice update on screening and surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: expert review. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1822-30.
25. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-54.e1-9.

26. Wagner M, Corcuera-Solano I, Lo G, Esses S, Liao J, Besa C, Chen N, Abraham G, Fung M, Babb JS, Ehman RL, Taouli B. Technical failure of MR elastography examinations of the liver: experience from a large single-center study. *Radiology*. 2017;284(2):401-12.
27. Cotrim HP, Parise ER, Figueiredo-Mendes C, Galizzi-Filho J, Porta G, Oliveira CP. Nonalcoholic fatty liver disease Brazilian Society of Hepatology consensus. *Arq Gastroenterol*. 2016;53(2):118-22.
28. Reeder SB, Sirlin CB. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010;18(3):337-57.
29. Hamilton G, Yokoo T, Bydder M, Cruite I, Schroeder ME, Sirlin CB, Middleton MS. In vivo characterization of the liver fat ¹H MR spectrum. *NMR Biomed*. 2011;24(7):784-90.
30. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(2):E462-8.
31. Hernando D, Kramer JH, Reeder SB. Multiplex fat-corrected complex R2* relaxometry: theory, optimization, and clinical validation. *Magn Reson Med*. 2013;70(5):1319-31.

32. Yokoo T, Serai SD, Pirasteh A, Bashir MR, Hamilton G, Hernando D, Hu HH, Hetterich H, Kühn JP, Kukuk GM, Loomba R, Middleton MS, Obuchowski NA, Song JS, Tang A, Wu X, Reeder SB, Sirlin CB; RSNA-QIBA PDFF biomarker committee. linearity, bias, and precision of hepatic proton density fat fraction measurements by using MR imaging: a meta-analysis. *Radiology*. 2018;286(2):486-98.
33. Bydder M, Hamilton G, de Rochefort L, Desai A, Heba ER, Loomba R, Schwimmer JB, Szeverenyi NM, Sirlin CB. Sources of systematic error in proton density fat fraction (PDFF) quantification in the liver evaluated from magnitude images with different numbers of echoes. *NMR Biomed*. 2018;31(1):10.1002/nbm.3843.
34. Cunha GM, Thai TT, Hamilton G, Covarrubias Y, Schlein A, Middleton MS, Wiens CN, McMillan A, Agni R, Funk LM, Campos GM, Horgan S, Jacobson G, Wolfson T, Gamst A, Schwimmer JB, Reeder SB, Sirlin CB. Accuracy of common proton density fat fraction thresholds for magnitude- and complex-based chemical shift-encoded MRI for assessing hepatic steatosis in patients with obesity. *Abdom Radiol (NY)*. 2020;45(3):661-71.
35. Mamidipalli A, Fowler KJ, Hamilton G, Wolfson T, Covarrubias Y, Tran C, Fazeli S, Wiens CN, McMillan A, Artz NS, Funk LM, Campos GM, Greenberg JA, Gamst A, Middleton MS, Schwimmer JB, Reeder SB, Sirlin CB. Prospective comparison of longitudinal change in hepatic proton density fat fraction (PDFF) estimated by magnitude-based MRI (MRI-M) and complex-based MRI (MRI-C). *Eur Radiol*. 2020;30(9):5120-9.

36. Punyanitya M, Clark PR. Assessment of Body Composition. In: Krentz A, Heinemann L, Hompesch M (editors). *Translational research methods for diabetes, obesity and cardiometabolic drug development*. London: Springer; 2015. p. 139-167.
37. Kühn JP, Hernando D, Muñoz del Rio A, Evert M, Kannengiesser S, Völzke H, Mensel B, Puls R, Hosten N, Reeder SB. Effect of multiplex spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology*. 2012;265(1):133-42.
38. St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, Pootrakul P, Robins E, Lindeman R. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*. 2005;105(2):855-61.
39. Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol*. 1993;170(2):105-14.
40. Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2012;56(5):1171-80.
41. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(4):195-203.
42. Semelka RC, Chung JJ, Hussain SM, Marcos HB, Woosley JT. Chronic hepatitis: correlation of early patchy and late linear enhancement patterns on gadolinium-enhanced MR images with histopathology initial experience. *J Magn Reson Imaging*. 2001;13(3):385-91.

43. Bandula S, Punwani S, Rosenberg WM, Jalan R, Hall AR, Dhillon A, Moon JC, Taylor SA. Equilibrium contrast-enhanced CT imaging to evaluate hepatic fibrosis: initial validation by comparison with histopathologic sampling. *Radiology*. 2015;275(1):136-43.
44. Varenika V, Fu Y, Maher JJ, Gao D, Kakar S, Cabarrus MC, Yeh BM. Hepatic fibrosis: evaluation with semiquantitative contrast-enhanced CT. *Radiology*. 2013;266(1):151-8.
45. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2006;239(2):425-37.
46. Banerjee R, Pavlides M, Tunnicliffe EM, Piechnik SK, Sarania N, Philips R, Collier JD, Booth JC, Schneider JE, Wang LM, Delaney DW, Fleming KA, Robson MD, Barnes E, Neubauer S. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. *J Hepatol*. 2014;60(1):69-77.
47. Guimaraes AR, Siqueira L, Uppal R, Alford J, Fuchs BC, Yamada S, Tanabe K, Chung RT, Lauwers G, Chew ML, Boland GW, Sahani DV, Vangel M, Hahn PF, Caravan P. T2 relaxation time is related to liver fibrosis severity. *Quant Imaging Med Surg*. 2016;6(2):103-14.
48. Levenberg K. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Q Appl Math*. 1944;2(2):164-8.

49. Marquardt DW. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J Soc Ind Appl Math.* 1963;11(2):431-41.
50. Filho HML, Chua-Anusorn W, Oliveira CP, Carrilho FJ, Lima F, Alves V, Clark MR. Novel mapping of fibrosis and hepatic inflammation in NASH patients with dual R2 MRI relaxometry. *J Hepatol.* 2017;66(Suppl. 1):S243.
51. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
52. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2004;1(2):98-105.
53. Clark PR, Chua-anusorn W, St Pierre TG. Reduction of respiratory motion artifacts in transverse relaxation rate (R2) images of the liver. *Comput Med Imaging Graph.* 2004;28(1-2):69-76.
54. Milford D, Rosbach N, Bendszus M, Heiland S. Mono-Exponential Fitting in T2-Relaxometry: Relevance of Offset and First Echo. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145255.
55. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.

56. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis.* 2012;32(1):3-13.
57. Scheuer PJ, Williams R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Pathol Bacteriol.* 1962;84:53-64.
58. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva Rde C, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol.* 2011;10(1):33-7.
59. Oliveira CP, Paredes A, Siddiqui M, Serfaty L, Chowdhury A, Stefano JT, Vanni DS, Boyett S, Sanyal AJ. The transcontinental variability of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatoma Res.* 2020;6:72.
60. Barros BSV, Monteiro FC, Terra C, Gomes MB. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its associated factors in individuals with type 1 diabetes: a cross-sectional study in a tertiary care center in Brazil. *Diabetol Metab Syndr.* 2021;13(1):33.
61. Fleiss JL, Tytun A, Ury HK. A simple approximation for calculating sample sizes for comparing independent proportions. *Biometrics.* 1980;36(2):343-6.
62. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012;24(3):69-71.

63. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, Coates TD. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005;106(4):1460-5.
64. Storey P, Thompson AA, Carqueville CL, Wood JC, de Freitas RA, Rigsby CK. R2* imaging of transfusional iron burden at 3T and comparison with 1.5T. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25(3):540-7.
65. Hernando D, Cook RJ, Qazi N, Longhurst CA, Diamond CA, Reeder SB. Complex confounder-corrected R2* mapping for liver iron quantification with MRI. *Eur Radiol*. 2021;31(1):264-75.
66. Hsu C, Caussy C, Imajo K, Chen J, Singh S, Kaulback K, Le MD, Hooker J, Tu X, Bettencourt R, Yin M, Sirlin CB, Ehman RL, Nakajima A, Loomba R. Magnetic resonance vs transient elastography analysis of patients with nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and pooled analysis of individual participants. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(4):630-637.e8.
67. Ajmera V, Loomba R. Can Elastography Differentiate Isolated Fatty Liver from Nonalcoholic Steatohepatitis? *Semin Liver Dis*. 2018;38(1):14-20.
68. Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(6):G1147-54.

69. Salameh N, Larrat B, Abarca-Quinones J, Pallu S, Dorvillius M, Leclercq I, Fink M, Sinkus R, Van Beers BE. Early detection of steatohepatitis in fatty rat liver by using MR elastography. *Radiology*. 2009;253(1):90-7.
70. Yin M, Glaser KJ, Manduca A, Mounajjed T, Malhi H, Simonetto DA, Wang R, Yang L, Mao SA, Glorioso JM, Elgilani FM, Ward CJ, Harris PC, Nyberg SL, Shah VH, Ehman RL. Distinguishing between Hepatic Inflammation and Fibrosis with MR Elastography. *Radiology*. 2017;284(3):694-705.
71. Qu Y, Middleton MS, Loomba R, Glaser KJ, Chen J, Hooker JC, Wolfson T, Covarrubias Y, Valasek MA, Fowler KJ, Zhang YN, Sy E, Gamst AC, Wang K, Mamidipalli A, Schwimmer JB, Song B, Reeder SB, Yin M, Ehman RL, Sirlin CB. Magnetic resonance elastography biomarkers for detection of histologic alterations in nonalcoholic fatty liver disease in the absence of fibrosis. *Eur Radiol*. 2021;31(11):8408-19.
72. Lin XZ, Horng MH, Sun YN, Shiesh SC, Chow NH, Guo XZ. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13(1):75-80.
73. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003;200(4):504-15.

74. Hara N, Iwasa M, Iwata K, Miyachi H, Tanaka H, Takeo M, Fujita N, Kobayashi Y, Takei Y. Value of the extracellular water ratio for assessment of cirrhotic patients with and without ascites. *Hepatol Res.* 2009;39(11):1072-9.
75. Martí-Bonmatí L, Talens A, del Olmo J, de Val A, Serra MA, Rodrigo JM, Ferrández A, Torres V, Rayón M, Vilar JS. Chronic hepatitis and cirrhosis: evaluation by means of MR imaging with histologic correlation. *Radiology.* 1993;188(1):37-43.
76. Wang HQ, Jin KP, Zeng MS, Chen CZ, Rao SX, Ji Y, Fu CX, Sheng RF. Assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B using MR extracellular volume measurements: Comparison with serum fibrosis indices. *Magn Reson Imaging.* 2019;59:39-45.
77. Pavlides M, Banerjee R, Tunnicliffe EM, Kelly C, Collier J, Wang LM, Fleming KA, Cobbold JF, Robson MD, Neubauer S, Barnes E. Multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of non-alcoholic fatty liver disease severity. *Liver Int.* 2017;37(7):1065-73.
78. Levin RL, Cravalho EG, Huggins CE. Effect of hydration on the water content of human erythrocytes. *Biophys J.* 1976;16(12):1411-26.
79. Rudolph AM. Hepatic and ductus venosus blood flows during fetal life. *Hepatology.* 1983;3(2):254-8.

80. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*. 1986;161(2):401-7.
81. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin ML, Vignaud J, Laval-Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*. 1988;168(2):497-505.
82. Lee Y, Lee SS, Kim N, Kim E, Kim YJ, Yun SC, Kühn B, Kim IS, Park SH, Kim SY, Lee MG. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging of the liver: effect of triggering methods on regional variability and measurement repeatability of quantitative parameters. *Radiology*. 2015;274(2):405-15.